84432-2
6
2-1

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

XPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

BOSTON MEDICAL LIBRARY 1961

214. BAND

MIT 218 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1951/52

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg
Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH
Printed in Germany

BOSTON
NOV 3 1952
MEDICAL LIBRARY

CATALOGUED
NOV 3 1952
D.C.P.

Inhalt des 214. Bandes.

Seite

Amelung, D., s. **F. Heim, W. Lanz** und **G. Gries**

Balogh, L., Sz. Donhoffer, Gy. Mestyán, T. Pap und **I. Tóth**, Über die Wirkung der Natriumsalze der Benzoe- und Salicylsäure, ihrer p-Aminoverbindungen und des Salicylamids auf den Sauerstoffverbrauch und die Körpertemperatur der Ratte 299

Bammer, H., und **K. E. Rothschuh**, Über eine Methode zur Messung der Leitungsgeschwindigkeit der Erregung im Froschherzstreifen zur Prüfung pharmakologischer Substanzen. Mit 6 Textabbildungen 367

Barron, E. S. G., s. **M. Reiter.**

Bauer, G., und **F. Lembeck**, Die stoffwechselsteigernde Wirkung des Noradrenalins. Mit 1 Textabbildung 262

Bauer, R., s. **V. Köhler.**

Becker-Freyseng, H., Über eine dosisabhängige paradoxe Wirkung des α-Tocopherols (Vitamin E) auf die Diurese 411

Bogatzki, M., s. **C. G. Schmidt** und **L. Fischer.**

Bommes, G., s. **K. Stuhlfauth** und **H. Neumaier.**

Brecht, K., Acetylcholinkontraktur und Acetylcholindiffusion. Mit 4 Textabbildungen 292

Brossmer, R., s. **P. Seifert.**

Donhoffer, Sz., s. **L. Balogh, Gy. Mestyán, T. Pap** und **I. Tóth.**

Emmrich, R., und **H. Petzold**, Über die Wirkung „lipotroper" Stoffe auf die Regeneration der Rattenleber. Mit 3 Textabbildungen 333

Enders, A., Die Ausschaltung des Geruchssinnes bei Dauerversuchen mit künstlichen Fetten 404

Engelhardt, A., s. **P. Holtz, W. S. Reichel, V. Henke** und **H.-J. Schümann.**

Erdmann, W. D., und **H. Mercker**, Untersuchungen über die Blutdrucksenkung nach d-Tubocurarin und die antagonistische Wirkung von Prostigmin. Mit 4 Textabbildungen 455

Fischer, L., s. **C. G. Schmidt** und **M. Bogatzki.**

Fischer, R., s. **J. Frey.**

—, s. **L. Heilmeyer** und **J. Frey.**

Fleckenstein, A., H. Günther und **H. J. Winker**, Adsorption und Haftfestigkeit pharmakologisch aktiver Alkaloid-Kationen an der Kollodium-Membran. Physikalisch-chemische Grundversuche zur „competitive Inhibition". Mit 3 Textabbildungen 38

—, und **H. Gerkhardt**, Über die biologische Bedeutung des hohen Zink-Gehalts in Schlangengiften. Zink als Schlangengift-Inhibitor. Mit 3 Textabbildungen 135

Seite

Fóti, M., Pharmakodynamische Passage-Untersuchungen an Hunden in Zusammenhang mit der Durchschneidung des Plexus mesentericus sup. Mit 8 Textabbildungen 481

Frank, O., und **V. Lachnit,** Die Nierentubuli im Intravitalmikroskop. Mit 2 Textabbildungen 507

Frey, E., Die Ähnlichkeit der Clearance-Werte. Mit 1 Textabbildung . . . 441

Frey, J., und **R. Fischer,** Der Einfluß von Hypophysenvorderlappenextrakten auf die Eiweißhyperergie der Ratte im Vergleich zu dem von ACTH und Cortison. Mit 2 Textabbildungen 423

—, s. **L. Heilmeyer** und **R. Fischer.**

Fritsch, H., und **H. Krupp,** Wirkung von Insecticiden auf ein isoliertes Ganglien-Muskel-Präparat von Dytiscus marginalis (Gelbrandkäfer). Mit 8 Textabbildungen 227

Gerkhardt, H., s. **A. Fleckenstein.**

Giebisch, G., H. Klupp und **S. Rapoport,** Quecksilberwirkung und osmotische Diurese beim Hund. Mit 6 Textabbildungen 562

Gollwitzer-Meier, Kl., und **H. Jungmann,** Zur Herzwirkung einiger Sympathicomimetica mit peripher gefäßerweiternder Wirkung. Mit 3 Textabbildungen 349

Görtz, H., und **F. Hartmann,** Versuche zur Regulation des onkotischen Drucks. Mit 6 Textabbildungen 67

Grethe, H., V. Köhler, W. Münich und **J. Scharf,** Histochemische Untersuchungen an der Cornea über den Einfluß von Monojodessigsäure, Phlorrhizin und Hyaluronidase auf die alkalische Phosphatase. Mit 1 Textabbildung 398

Gries, G., s. **F. Heim, W. Lanz** und **D. Amelung.**

Günther, H., s. **A. Fleckenstein** und **H. J. Winker.**

Hardegg, W., Zur Kinetik der Cholinesterase-Hemmung durch Prostigmin. Mit 6 Textabbildungen 540

Hartmann, F., R. Hertel, G. Schulze und **H. Wellmer,** Über die lipotrope Wirkung von Vitamin E und Cystin, Methionin, Inosit und Invertzucker an der tetrachlorkohlenstoffvergifteten Ratte 152

—, s. **H. Görtz.**

Harvey, S. C., s. **S. Loewe.**

Häusler, H. F., und **F. Lex,** Ein elektrisch gesteuertes Gasventil. Mit 1 Textabbildung 211

Hauss, W. H., H. Kreuziger und **L. Lammers,** Zur Reaktion der Eosinophilen im Tierversuch. Mit 4 Textabbildungen 83

Hayek, H. v., Über die Veränderlichkeit der Oberflächenspannung in den Alveolen und ihre Bedeutung für die Retraktionskraft der Lunge. Mit 1 Textabbildung 266

—, Über flimmertragendes und sezernierendes Bronchialepithel und die Einwirkung von Aludrin. Mit 2 Textabbildungen 269

Heilmeyer, L., J. Frey und **R. Fischer,** Über Wirkungen von adrenotropem Hypophysenvorderlappenhormon, 11-Dehydro- und 11-Desoxy-Corticosteron im Modellversuch am Tier. Mit 4 Textabbildungen 416

Heim, F., W. Lanz, G. Gries und **D. Amelung,** Über den Einfluß von Monosacchariden auf den Alkoholabbau und die Alkoholtoleranz. Mit 2 Textabbildungen 280

Henke, V., s. **P. Holtz, W. S. Reichel, A. Engelhardt** und **H.-J. Schümann.**

Hertel, R., s. **F. Hartmann, G. Schulze** und **H. Wellmer.**

Seite

Hess, G., und **R. Kopf,** Methylthiouracilwirkung und Dijodtyrosin. Mit 2 Textabbildungen 451

Hillecke, N., Beitrag zur Untersuchung bromhaltiger Pharmaka. Mit 1 Textabbildung 174

Hof, C. von, und **H.-H. Schneider,** Über die Wirkungsweise von Magnesium im Gegensatz zu Curarin und Nicotin. Mit 1 Textabbildung 176

Höfert, H.-J., s. **A. von Oer.**

Hofmann, H. Th., Über Wirkungen von Bienengift am Skeletmuskel des Frosches. Mit 6 Textabbildungen 523

Holtz, P., W. S. Reichel, A. Engelhardt, V. Henke und **H.-J. Schümann,** Über den Mechanismus der Ultraschallwirkung. Mit 5 Textabbildungen . . . 392

Hug, O., W. Lippert und **P. Moser,** Morphologische Veränderungen der Erythrocyten bei der Hypotoniehämolyse. Mit 6 Textabbildungen . . . 308

Jankowitz, G., s. **P. Seifert.**

Jung, F., und **R. Kuon,** Zum inaktiven Hämoglobin des Blutes. Mit 1 Textabbildung 103

Jungmann, H., s. **Kl. Gollwitzer-Meier.**

Kallee, E., s. **F. Lohss.**

Kaller, H., Das Konzentrationsdiagramm als Hilfsmittel zur Bestimmung oder Herstellung einwirkender Endkonzentrationen bei Versuchen in vitro. Mit 1 Textabbildung 195

Keibl, E., K. H. Spitzy und **L. Storch,** Zum Problem des Leukocytenstoffwechsels. III. Mitteilung. Einfluß von N-Lost und N-Lost + Urethan auf den Stoffwechsel myeloisch-leukämischer Zellen. Mit 2 Textabbildungen 534

Keller, H., s. **H. F. Zipf.**

Kirchheim, D., Toxizität und Wirkung einiger Thiuramdisulfidverbindungen auf den Alkoholstoffwechsel 59

Klupp, H., s. **G. Giebisch** und **S. Rapoport.**

Knoth, W., Untersuchungen über den „Vitamin T-Komplex Goetsch" mit Hilfe der Gewebezüchtung. Mit 4 Textabbildungen 501

Köhler, V., und **R. Bauer,** Die antagonistische Wirkung von Monojodessigsäure und Desoxycorticosteronacetat auf die Farbstoffphagocytose der Rattenleukocyten 447

—, s. **H. Grethe, W. Münnich** und **J. Scharf.**

Kopf, R., s. **G. Hess.**

Kracht, J., Über die reversible Inaktivierung des thyreotropen Hormons. Mit 1 Textabbildung 433

Kreuziger, H., s. **W. H. Hauss** und **L. Lammers.**

Krupp, H., s. **H. Fritsch.**

Kuon, R., s. **F. Jung.**

Lachnit, V., s. **O. Frank.**

Lammers, L., s. **W. H. Hauss** und **H. Kreuziger.**

Langecker, H., Die Ausscheidung von 17-Ketosteroiden bei der Ratte. Mit 2 Textabbildungen 490

Lanz, W., s. **F. Heim, G. Gries** und **D. Amelung.**

Lembeck, F., s. **G. Bauer.**

Leusser, K., s. **M. Reiter.**

Lex, F., s. **H. F. Häusler.**

Leyers, H., s. **P. Seifert.**

Lindner, E., s. **O. Schaumann.**

Seite

Lippert, W., s. **O. Hug** und **P. Moser.**

Loewe, S., and **S. C. Harvey**, Equidistance Concept and Structure-Activity Relationsship of Curarizing Drugs. With 2 figures 214

Lohss, F., und **E. Kallee**, Ein neues Verfahren zur colorimetrischen Schnellbestimmung von Pyramidon im Serum. Mit 8 Textabbildungen 202

Lübken, W., Untersuchungen über Glykogenbildung und deren Beeinflussung an Leberschnitten von Ratten 253

Ludwigs, N., und **K. Wiemers**, Über die adrenolytische Wirkung aralkylierter Adrenalin-Derivate an der Samenblase des Meerschweinchens. Mit 2 Textabbildungen 55

Maier, K. H., s. **G. Ruhenstroth-Bauer.**

Mechelke, K., und **E. Nusser**, Über die Kreislaufwirkung des Tetraäthylammoniumbromid (TEAB), des N,N,N′,N-3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-azapentan-1,5-diammonium-dibromid (Ciba 9295) und des Magnesiumsulfates ($MgSO_4$) bei normalen Menschen. Mit 7 Textabbildungen . . . 1

Mercker, H., s. **W. D. Erdmann.**

Mestyán, Gy., s. **L. Balogh, Sz. Donhoffer, T. Pap** und **I. Tóth.**

Moll, H., Blutgerinnungsbeeinflussung durch Cystaminhomologe. Mit 9 Textabbildungen 374

Moser, P., s. **O. Hug** und **W. Lippert.**

Mücher, H., und **H.-W. Wendt**, Gruppenversuch zur Bestimmung der kritischen Verschmelzungsfrequenz beim binokularen Sehen: Änderungen unter Koffein und nach normaler Tagesarbeit. Mit 1 Textabbildung . . 29

Münich, W., s. **H. Grethe, V. Köhler** und **J. Scharf.**

Nacke, O., Über die Verwendung von Mäusen zur Prüfung pyretischer und antipyretischer Substanzen. Mit 5 Textabbildungen 147

Neumaier, H., s. **K. Stuhlfauth** und **G. Bommes.**

Nusser, E., s. **K. Mechelke.**

Oer, A. von, und **H.-J. Höfert**, Zur Methodik der flammenphotometrischen Bestimmung von Na, K und Ca im Blutserum. Mit 7 Textabbildungen . 109

Pap, T., s. **L. Balogh, Sz. Donhoffer, Gy. Mestyán** und **I. Tóth.**

Petzold, H., s. **R. Emmrich.**

Pfeffer, K. H., W. Ruppel, Hj. Staudinger und **L. Weißbecker**, Getrennte Bestimmung der 11-Oxy- und 11-Desoxycorticoide. (Methode und einige Ergebnisse.) 165

Rapoport, S., s. **G. Giebisch** und **H. Klupp.**

Reichel, W. S., s. **P. Holtz, A. Engelhardt, V. Henke** und **H.-J. Schümann.**

Reiter, M., und **E. S. G. Barron**, Über die direkte Fermentwirkung von Herzglykosiden 341

—, und **K. Leusser**, Einfluß der Methylsubstitution auf die Hämiglobin-(Methämoglobin-) Bildung und die Allgemeintoxizität des Anilins . . . 158

Remmer, H., und **E. Seiler**, Der Einfluß einer Hitzebehandlung roter Blutkörperchen auf die Silberwirkung. Mit 5 Textabbildungen 272

Rohkrämer, H., und **W. Wernitz**, Thiosemicarbazone und Gewebsatmung, zugleich ein Beitrag zumAbbau des Conteben. Mit 3 Textabbildungen 513

— —, Thiosemicarbazone und Hyaluronidase. Mit 1 Textabbildung . . 518

Rothschuh, K. E., s. **H. Bammer.**

Ruhenstroth-Bauer, G., und **K. H. Maier**, Versuche zum Nachweis eines spezifischen erythropoetischen Hormons. II. Mitteilung. Mit 5 Textabbildungen 464

Ruppel, W., s. **K. H. Pfeffer, Hj. Staudinger** und **L. Weißbecker.**

Seite

Scharf, J., s. **H. Grethe, V. Köhler** und **W. Münich.**

Schaumann, O., und **E. Lindner,** Neue synthetische Verbindungen der „Polamidonreihe" mit parasympathicolytischer Wirkung. Mit 2 Textabbildungen 93

Schmidt, C. G., M. Bogatzki und **L. Fischer,** Die Beziehungen zwischen Schilddrüse und Muskelatrophie. Mit 1 Textabbildung 381

Schneider, H.-H., s. **C. von Hof.**

Schönberg, W.-D. v., Zur Technik der Flammenphotometrie in der Klinik. Mit 1 Textabbildung 358

Schulze, G., Quantitative Untersuchungen an den Lipoiden des menschlichen Blutserums. Mit 2 Textabbildungen 473

—, s. **F. Hartmann, R. Hertel** und **H. Wellmer.**

Schümann, H.-J., s. **P. Holtz, W. S. Reichel, A. Engelhardt** und **V. Henke.**

Seifert, P., und **R. Brossmer,** Eine Testflecken-Methode zur Bestimmung kleinster Arsenmengen im biologischen Material. Mit 2 Textabbildungen 121

—, und **H. Leyers,** Methanol und WIDMARK-Bestimmung. Mit 3 Textabbildungen 124

—, und **G. Jankowitz,** Modifizierte nephelometrische Methode zum Nachweis eines Morphin-Abusus 197

—, Zur Frage der Relation von Blutalkohol zum Atemalkohol. Mit 7 Textabbildungen 427

Seiler, E., s. **H. Remmer.**

Sielaff, H.-J., Zur Pharmakodynamik des cholinergischen Wirkbildes am menschlichen Dünndarm. Mit 11 Textabbildungen 74

Spitzy, K. H., s. **E. Keibl** und **L. Storch.**

Staudinger, Hj., s. **K. H. Pfeffer, W. Ruppel** und **L. Weißbecker.**

Storch, L., s. **E. Keibl** und **K. H. Spitzy.**

Stuhlfauth, K., H. Neumaier und **G. Bommes,** Der Einfluß von Laevulose auf die Methylalkoholvergiftung bei Ratten 556

Stüttgen, G., Arterenol-Umkehr nach Sympathicolytica am Darm. Mit 1 Textabbildung 193

Tóth, I., s. **L. Balogh, Sz. Donhoffer, Gy. Mestyán** und **T. Pap.**

Weidmann, H., Zur quantitativen Bestimmung sedativer Wirkungen im Tierversuch. Mit 1 Textabbildung 497

Weißbecker, L., s. **K. H. Pfeffer, W. Ruppel** und **Hj. Staudinger.**

Wellmer, H., s. **F. Hartmann, R. Hertel** und **G. Schulze.**

Wendt, H.-W., s. **H. Mücher.**

Wernitz, W., s. **H. Rohkrämer.**

Wiemers, K., s. **N. Ludwigs.**

Winker, H. J., s. **A. Fleckenstein** und **H. Günther.**

Wolf, J., Versuche zum Nachweis exzitierender Wirkungen narkotischer Stoffe und Rauschgifte mit Hilfe des Elektroschockverfahrens. Mit 7 Textabbildungen 14

Zetler, G., Ein Beitrag zur Frage der Organspezifität von Histaminrezeptoren 185

—, Über die Beeinflussung der lokalen Erfrierung durch allgemeine Vorbehandlung mit einem Antihistaminicum (Versuche am Kaninchenohr). Mit 8 Textabbildungen 316

Zipf, H. F., und **H. Keller,** Synergistisches Verhalten von Cardiazol, arterieller CO_2-Spannung und Wasserstoffionenkonzentration. Mit 4 Textabbildungen 242

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 1—13 (1951).

Aus der medizinischen Klinik der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Über die Kreislaufwirkung des Tetraäthylammoniumbromid (TEAB)*, des N,N,N′,N-3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-azapentan-1,5-diammonium-dibromid (Ciba 9295)** und des Magnesiumsulfates ($MgSO_4$) bei normalen Menschen.

Von
Kurt Mechelke und Egbert Nusser.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. April 1951.)

Die ganglionblockierenden Medikamente TEAB, 9295 und $MgSO_4$ beeinflussen das autonome Nervensystem durch Hemmung der synaptischen Übertragung sympathischer und parasympathischer Erregungen.

Vergleichende pharmakologische Untersuchungen führten zu der Feststellung, daß 9295 in Stärke und Dauer der Wirkung dem TEAB wesentlich überlegen ist (Bein und Meier[1]).

In Tierversuchen wurden nach 9295 eine Blutdrucksenkung bei gleichzeitiger Pulsverlangsamung und Erhöhung des Stromvolumens der Extremitäten festgestellt. Die pressorischen Reflexe des Karotis-Sinus werden durch diese Substanzen abgeschwächt oder unterdrückt. Die pressorische Adrenalin- und Arterenolwirkung wird verstärkt (Bein und Meier[1]).

Moe und Freyburger[2] berichten zusammenfassend über die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen mit TEAB. Die Wirkung auf die Pulsfrequenz hängt nach ihrer Ansicht von dem bestehenden Gleichgewicht zwischen den vagalen und sympathischen Einflüssen ab. Da beim ruhenden Menschen der Vagustonus relativ hoch sei, würde TEAB eine Zunahme der Herzschlagfolge bewirken. Bei Tieren dagegen, bei denen unter der Anästhesie mit Barbitursäurepräparaten ein niedriger Vagustonus besteht, tritt nach TEAB-Gabe eine Abnahme der Pulsfrequenz auf. Zusätzlich soll TEAB eine direkte chronotrope Wirkung besitzen, die in Abhängigkeit von der Dosierung in positiver und negativer Richtung hervortreten kann. Unabhängig von der ganglienblockierenden Eigenschaft des TEAB wird auf den hypodynamen Herzmuskel eine positiv inotrope Wirkung angenommen. Das Minutenvolumen steigt mit der Zunahme der Pulsfrequenz. Eine beträchtliche Mehrdurchblutung in den Extremitäten wurde festgestellt, so daß vermutet wird, daß gleichzeitig in den viszeralen Gefäßgebieten eine entsprechende Abnahme der Blutzufuhr erfolgt.

Beim gesunden Menschen soll nach TEAB eine Abnahme des rechten Vorhofdruckes bei geringem Anstieg des Minutenvolumens erfolgen. In Armen und Beinen wurde nach TEAB eine vermehrte Blutzufuhr festgestellt.

* TEAB = TMD 10 Glutan-Chemie, Würzburg.
** Ciba 9295 = Pendiomid.

Kreislaufanalytische Untersuchungen mit der Methode nach Broemser-Ranke von Heidelmann, Marx und Hasse[3] ergaben, daß nach TEAB sofort eine Einengung der Blutdruckamplitude eintritt, die durch Senkung des systolischen und Erhöhung des diastolischen Blutdrucks bewirkt wird. In der überwiegenden Mehrzahl der Versuche fand sich eine Abnahme des Schlagvolumens bei gleichzeitiger Zunahme des peripheren Strömungswiderstandes, der Pulswellengeschwindigkeit und des elastischen Widerstandes.

Eine kurzdauernde Leitungsblockade nach Magnesium-Chloridinjektion bei Reizung prä- und postganglionärer Fasern des Ganglion cervicale superior konnte Stanbury[4] feststellen. Durch Blockade der Akzeleransfasern wurde gleichzeitig eine Verlangsamung der Herztätigkeit gefunden. Bei vegetativen Dysregulationen wurden von Hommer[5] therapeutische Erfolge mit $MgSO_4$-Injektionen (25%) gesehen.

Da besonders die Arbeit von Moe und Freyburger[2] einen vollständigen Überblick über die experimentellen und klinischen Ergebnisse bringt, erübrigt sich für unsere Fragestellung eine Wiederholung derselben.

Ziel unserer Untersuchungen war es, die Kreislaufwirkungen dieser ganglienblockierenden Substanzen am gesunden Menschen näher zu analysieren.

Methodik.

Die Untersuchungen wurden an kreislaufgesunden Vp. im Alter von 20 bis 30 Jahren durchgeführt. In einer 1. Versuchsreihe wurden die Kreislaufveränderungen mit den Methoden der fortlaufenden Registrierung von Pulsfrequenz, systolischem Blutdruck, Ohr- und Fingervolumen, Sauerstoffsättigung an Ohr und Finger und Temperaturen an Ohr und Finger nach Matthes[6] registriert. Die Dosen und die Injektionsdauer werden bei den Einzelversuchen erwähnt. In einer 2. Versuchsreihe bestimmten wir in je 5 Versuchen die physikalischen Kreislaufgrößen nach Broemser-Ranke[7] und Wezler-Böger[8] sowie die Anspannungs- und Austreibungszeit des Herzens nach Blumberger[9].

Ergebnisse.

1. Einzelinjektion von TEAB (19 Versuche): Die Abb. 1a zeigt die Kreislaufwirkung einer Injektion von 300 mg TEAB in 5 min. Wir sehen, daß bereits während der Injektion eine Volumenzunahme an Ohr und Finger resultiert bei gleichbleibender Sauerstoffsättigung des Blutes. Die Hauttemperatur an Ohr und Finger nimmt zu. Mit dem Beginn der Mehrdurchblutung der Peripherie sehen wir eine Zunahme der Pulsfrequenz bei Abnahme des systolischen Blutdrucks. Die Zunahme der Pulsfrequenz könnte einmal über die Abschwächung pressorezeptorischer Reflexe erklärt werden. Darüber hinaus ist an eine direkte Beeinflussung der Herzschlagfolge im Sinne einer positiv chronotropen Wirkung zu denken. Die respiratorischen Schwankungen der Herzschlagfolge werden aufgehoben. Dieses charakteristische Verhalten der Pulsfrequenz finden wir in gleicher Weise nach intravenöser Atropininjektion. Der erniedrigte systolische Blutdruck zeigt unveränderte respiratorische Blutdruckwellen.

Die Tab. 1 gibt eine Zusammenstellung der Ergebnisse der Einzelinjektionen wieder. Bemerkenswert ist, daß die Sauerstoffsättigung des Blutes besonders am Finger mehrfach eine deutliche Zunahme zeigt.

2. Einzelinjektionen von 9295 (22 Versuche): Die Abb. 1b zeigt die weitgehende Übereinstimmung der Kreislaufreaktion nach Injektion von 9295 mit derjenigen nach TEAB-Gabe. Auch nach intravenöser Verabfolgung von 9295 kommt es zu einer Mehrdurchblutung der Peripherie. Auf der Abb. 1b wird die Zunahme der Sauerstoffsättigung be-

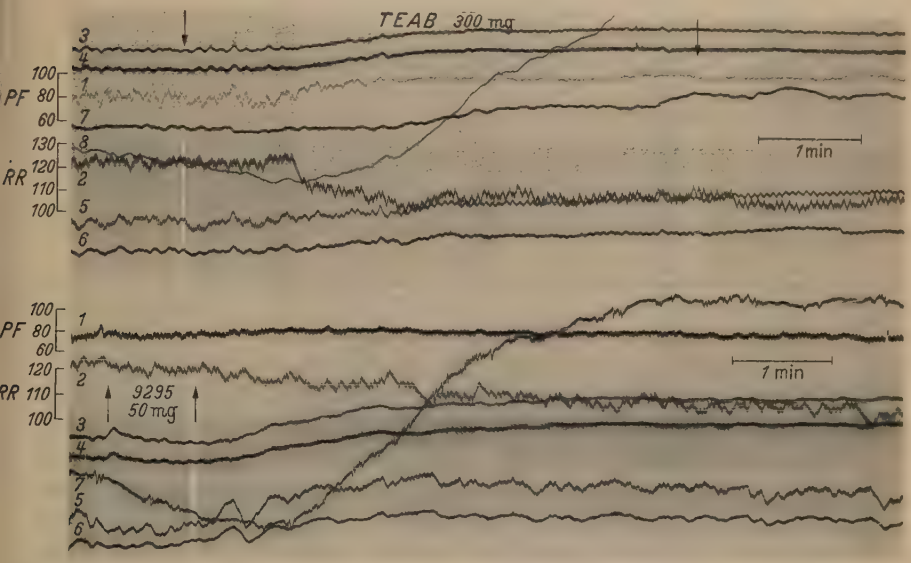


Abb. 1. Obere Kurve: Vp. E. K. Intravenöse Injektion von 300 mg TEAB in 5 min. — Untere Kurve: Vp. E. K. Intravenöse Injektion von 50 mg 9295 in 55 sec. — 1. Pulsfrequenz. 2. Systol. Blutdruck. 3. Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen). 4. Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung). 5. Fingerdurchleuchtungskurve ultrarot (Fingervolumen). 6. Fingerdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung). 7. Ohrtemperatur. 8. Fingertemperatur.

sonders am Finger deutlich. Die Ohrtemperatur nimmt zu. Der systolische Blutdruck fällt etwas ab bei geringer Zunahme der Pulsfrequenz.

Die Tab. 2 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen. Man gewinnt bei vergleichender Betrachtung der Kurven den Eindruck, als wenn die Wirkungsdauer und die Intensität der Wirkung nach 9295 stärker ist als nach TEAB.

3. Beeinflussung der Adrenalin-Kreislaufwirkung durch 9295 (7 Versuche): Die Abb. 2 möge für diese Untersuchungen als Beispiel dienen. Im oberen Teil der Kurve sehen wir die typische, von Matthes[6] beschriebene Adrenalin-Kreislaufwirkung.

Vasokonstriktion an Ohr und Finger mit Abnahme der Sauerstoffsättigung am Finger, Abnahme der Hauttemperatur an Ohr und Finger. Initiale Tachykardie,

TEAB-Versuche Tabelle 1.

Versuch Nr.	Vp.	Dosis mg	Injekt.-Dauer (Min.)	Pulsfrequenz			RR-Abweichungen	
				Ruhe	60″ nach Injekt.-Ende	4′ nach Injekt.-Ende	1′ nach Injekt.-Ende	4′ nach Injekt.-Ende
1	H. K.	200	6	80	90	78	— 7	— 10
2	H. A.	200	5	69	80	80	— 25	— 20
3	R. S.	200	3	70	76	75	— 10	— 4
4	O. S.	200	3	70	76	75	— 10	— 4
5	H. H.	200	3	66	81	75	— 28	— 22
6	P. R.	250	3	70	80	75	— 18	— 15
7	A. B.	250	12,5	64	80	73	+ 7	+ 4
8	O. St.	250	4	70	95	90	— 25	— 10
9	K. W.	250	3	70	88	—	± 0	—
10	K. W.	250	2,5	81	90	90	— 37	— 10
11	H. K.	300	5	50	55	70	+ 5	+ 5
12	M. K.	300	5	60	65	70	+ 5	+ 3
13	P. R.	300	5	65	88	85	— 22	— 20
14	J. H.	300	5	60	60	60	— 5	± 0
15	O. S.	300	3	80	100	90	— 30	— 12
16	G. G.	300	5	80	85	85	— 20	— 20
17	E. K.	300	5	69	75	70	— 25	— 20
18	F. B.	300	5	62	75	75	— 3	— 5
19	J. H.	350	7	72	80	80	— 8	± 0

nach Abklingen derselben schneller Anstieg des systolischen Blutdrucks auf seinen Gipfelwert. Nach kurzer Zeit wieder Absinken desselben auf seinen Ausgangswert.

Im unteren Teil der Kurve wird die Kreislaufwirkung von 9295 sehr deutlich wiedergegeben. Ohr- und Fingervolumen nehmen erheblich zu bei gleichzeitiger Zunahme der Sauerstoffsättigung am Finger und Zunahme der Hauttemperatur an beiden Registrierstellen. Der systolische Blutdruck fällt ab, während die Pulsfrequenz ansteigt. Die nachfolgende Adrenalin-Kreislaufwirkung tritt deutlich verstärkt auf. Die Vasokonstriktion an Ohr und Finger ist kräftiger und ausgiebiger als bei der ersten Injektion. Der systolische Blutdruck steigt auf einen höheren Wert an und fällt von diesem langsamer wieder ab. Gleichzeitig mit der Blutdrucksteigerung sehen wir eine anhaltende Beschleunigung der Pulsfrequenz. Die Verstärkung der Blutdruckwirkung des Adrenalins nach 9295 zeigt im Blutdruck- und Pulsfrequenzverhalten weitgehende Übereinstimmung mit den Kurvenbildern, wie sie nach Sympatolgabe nach vorheriger Atropinisierung gefunden wurden. Unterschiedlich ist die Wirkung auf den peripheren Kreislauf. Nach vorheriger Gabe von 9295 sehen wir nach Adrenalin immer eine verstärkte Vasokonstriktion, während dies nach Sympatol nach Atropinisierung nicht beobachtet werden konnte. Die Ursache hierfür dürfte darin liegen, daß nach Atropin keine periphere Mehrdurchblutung eintritt. Die durch 9295 erweiterten peripheren Gefäße können viel ausgiebiger von der

TEAB-Versuche.

Ohr			Finger		
Volumen	O_2-Sättigung	Temperatur	Volumen	O_2-Sättigung	Temperatur
Zunahme	gleichbl.	—	Zunahme	Zunahme	Zunahme
,,	,,	Zunahme	,,	,,	,,
,,	,,	gleichbl.	gleichbl.	gleichbl.	gleichbl.
,,	,,	,,	,,	,,	,,
,,	,,	,,	,,	,,	,,
,,	,,	—	Zunahme	,,	—
,,	,,	—	—	—	—
,,	,,	Zunahme	Zunahme	Zunahme	gleichbl.
,,	,,	,,	,,	,,	Zunahme
gleichbl.	,,	gleichbl.	,,	gleichbl.	,,
Zunahme	Zunahme	Zunahme	,,	Zunahme	,,
,,	,,	,,	,,	,,	,,
,,	gleichbl.	,,	gleichbl.	gleichbl.	gleichbl.
,,	,,	,,	Zunahme	Zunahme	Zunahme
,,	Zunahme	,,	—	—	,,
,,	gleichbl.	,,	Zunahme	gleichbl.	,,
,,	,,	,,	,,	,,	,,
,,	,,	,,	gleichbl.	,,	gleichbl.
ger. Zun.	,,	ger. Zun.	,,	,,	,,

vasokonstriktorischen Wirkung des Adrenalins erfaßt werden. Da bei dieser erheblichen arteriellen Druckerhöhung keine Bradykardie eintritt, ist eine weitgehende Ausschaltung pressorezeptorischer Reflexe anzunehmen. Im gleichen Sinne muß auch das Ausbleiben der respiratorischen Pulsfrequenzschwankungen nach den Einzelinjektionen von 9295 und TEAB gedeutet werden, da die Untersuchungen von Matthes und Ebeling[10] und Mechelke und Meitner[11] ergeben haben, daß die Steuerung der respiratorischen Arrhythmie neben dem Bainbridge-Reflex auch über pressorezeptorische Reflexe erfolgt.

Wählt man die Adrenalindosis kleiner (12,5 oder 25 γ Adrenalin), so sieht man, daß der initiale Blutdruckabfall nach 9295 in gleicher Stärke auftritt oder aber durch 9295 abgeschwächt wird, während der darauffolgende sekundäre Blutdruckanstieg durch 9295 verstärkt wird.

4. Intraarterielle Injektion in die linke Art. fem. von TEAB und 9295 (17 Versuche): Wir sehen in der überwiegenden Mehrzahl der Versuche eine erhebliche Volumenzunahme der linken Großzehe bei gleichzeitiger beträchtlicher Aufbesserung der Sauerstoffsättigung des Blutes (Abb. 3). Auf Grund dieser Untersuchungen möchten wir es für denkbar halten, daß auch durch Angriff des Medikamentes am nervalen terminalen Endreticulum eine Durchblutungszunahme erfolgen kann. Die bei arterieller Injektion besonders deutlich hervortretende Aufbesserung der Sauerstoffsättigung läßt an eine Abnahme

9295-Versuche Tabelle 2

Versuch Nr.	Vp.	Dosis mg	Injekt.-Dauer (Sek.)	Pulsfrequenz			RR-Abweichungen	
				Ruhe	60″ nach Injekt.-Ende	4′ nach Injekt.-Ende	1′ nach Injekt.-Ende	4′ nach Injekt.-Ende
1	F. P.	50	66	66	70	78	— 2	— 3
2	F. B.	50	70	86	100	106	— 5	+ 5
3	D. B.	50	60	75	86	90	— 15	— 15
4	E. K.	50	50	75	99	96	— 22	— 28
5	O. S.	50	60	84	90	95	— 60	— 55
6	E. K.	50	50	80	90	95	— 10	— 20
7	R. H.	50	60	81	85	90	— 20	— 15
8	D. B.	50	80	90	95	105	— 30	— 35
9	H. F.	50	50	75	75	80	— 15	— 20
10	K. G.	50	60	66	66	66	+ 5	+ 8
11	He.	50	20	55	64	68	— 15	— 22
12	Ma.	50	30	85	90	95	— 25	— 10
13	Ne.	50	30	66	75	80	— 22	— 30
14	He.	50	30	65	65	70	— 10	— 15
15	Wi.	50	20	60	70	75	— 20	— 20
16	Wö.	50	40	55	60	55	— 15	— 35
17	R. G.	50	20	60	66	63	— 20	— 20
18	D. B.	75	40	70	70	75	— 10	— 12
19	F. B.	75	60	84	105	110	— 10	+ 5
20	F. P.	75	40	66	80	75	— 10	— 5
				Vergleichs-Versuche:				
21	J. H.	25	20	58	60	70	— 2	— 7
22	J. H.	75	20	57	69	68	— 10	— 15

der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz infolge Eröffnung der arterio-venösen Anastomosen bei gleichzeitiger Mehrdurchblutung denken.

Während der Injektion der Medikamente oder kurz danach bemerkte die Mehrzahl der Versuchspersonen ein deutliches Wärmegefühl im linken Bein. Bei Kranken mit peripheren Durchblutungsstörungen konnten wir nach i. a. Injektion in die Art. rad. außer dem mehrere Stunden anhaltenden Wärmegefühl bei gleichzeitigem Verschwinden der Schmerzen eine abgegrenzte Rötung der Haut unterhalb der Injektionsstelle feststellen, während die übrigen erkrankten Gefäßprovinzen anderer Gliedmaßen unbeeinflußt blieben.

In der Tab. 3 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt.

5. Beeinflussung der Doryl- und Cholinchlorid-Kreislaufwirkung durch 9295: Die Kreislaufwirkung nach Injektion von Cholinchlorid und Doryl wurde von Matthes[6] beschrieben.

a) 1. Injektion 0,3 mg Cholinchlorid; 2. Injektion 50 mg 9295 nach 2 min; 3. Injektion 0,3 mg Cholinchlorid. — Nach der 2. Cholinchloridinjektion tritt die Volumenzunahme an Ohr und Finger weniger deutlich hervor. — Im Blutdruck- und Pulsfrequenzverhalten ergeben sich zwischen der 1. und 3. Injektion keine wesentlichen Unterschiede.

9295-Versuche.

Ohr			Finger		
Volumen	O_2-Sättigung	Temperatur	Volumen	O_2-Sättigung	Temperatur
Zunahme	gleichbl.	gleichbl.	Zunahme	Zunahme	Zunahme
,,	Zunahme	Zunahme	,,	,,	,,
,,	,,	,,	,,	,,	,,
,,	,,	,,	,,	gleichbl.	,,
,,	,,	gleichbl.	,,	,,	gleichbl.
,,	gleichbl.	Zunahme	,,	Zunahme	—
,,	Zunahme	,,	,,	gleichbl.	ger. Zun.
,,	,,	,,	,,	Zunahme	Zunahme
,,	,,	,,	,,	,,	,,
gleichbl.	gleichbl.	gleichbl.	,,	,,	,,
,,	,,	,,	gleichbl.	gleichbl.	gleichbl.
Zunahme	,,	—	Zunahme	,,	,,
,,	Zunahme	Zunahme	,,	,,	Zunahme
,,	gleichbl.	,,	,,	Zunahme	,,
,,	,,	gleichbl.	,,	,,	,,
gleichbl.	,,	,,	,,	ger. Zun.	ger. Zun.
,,	,,	—	—	—	—
Zunahme	,,	Zunahme	Zunahme	gleichbl.	Zunahme
,,	,,	,,	—	—	,,
,,	,,	,,	Zunahme	Zunahme	,,
		Vergleichs-Versuche:			
gleichbl.	gleichbl.	Zunahme	Zunahme	gleichbl.	ger. Zun.
Zunahme	,,	,,	,,	,,	Zunahme

Tabelle 3.

Vers.-Nr.	Dosis	Bein		Ohr	
		Volumen	Sauerstoff-sättigung	Volumen	Sauerstoff-sättigung
1	75 mg 9295	Zunahme	Zunahme	gleichbl.	gleichbl.
2	100 mg 9295	,,	,,	,,	,,
3	Desgleichen	starke Zun.	starke Zun.	ger. Zun.	,,
4	,,	,,	,,	,,	,,
5	,,	,,	,,	,,	,,
6	,,	,,	,,	Zunahme	,,
7	,,	,,	,,	ger. Zun.	ger. Zun.
8	,,	,,	,,	Zunahme	,,
9	,,	Zunahme	Zunahme	gleichbl.	gleichbl.
10	,,	starke Zun.	starke Zun.	ger. Zun.	,,
11	,,	,,	,,	Zunahme	,,
12	,,	Zunahme	Zunahme	ger. Zun.	,,
13	,,	starke Zun.	starke Zun.	Zunahme	,,
14	200 mg TEAB	Zunahme	gleichbl.	ger. Zun.	,,
15	Desgleichen	,,	Zunahme	gleichbl.	,,
16	,,	starke Zun.	starke Zun.	Zunahme	,,
17	,,	ger. Zun.	ger. Zun.	,,	,,

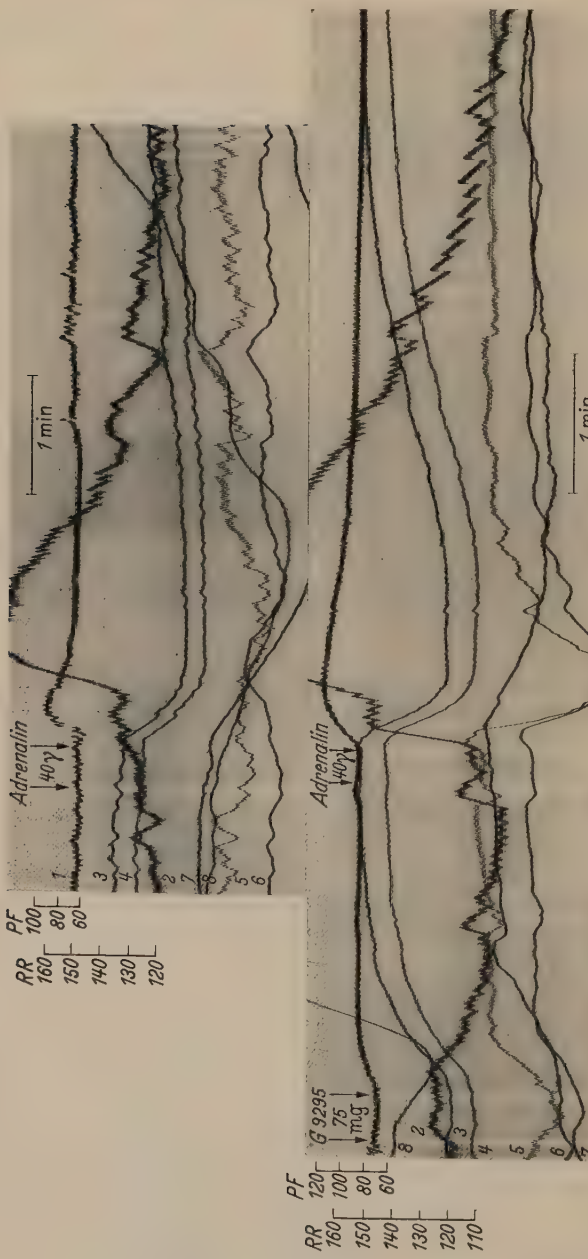


Abb. 2. Obere Kurve: Vp. J. N. Intravenöse Injektion von 40 γ Adrenalin in 20 sec. — Untere Kurve: Vp. J. N. Intravenöse Injektion von 75 mg 9295 in 20 sec. 150 sec später 3. Injektion von 40 γ Adrenalin in 20 sec. — 1. Pulsfrequenz. 2. Systol. Blutdruck. 3. Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen). 4. Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung). 5. Fingerdurchleuchtungskurve ultrarot (Fingervolumen). 6. Fingerdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung). 7. Ohrtemperatur. 8. Fingertemperatur.

b) 1. Injektion 25 γ Doryl; 2. Injektion 75 mg 9295, nach 2 min 3. Injektion 25 γ Doryl. — Deutlich abgeschwächte Vasodilatation nach der 2. Dorylinjektion an Ohr und Finger. Gleiches Verhalten von Pulsfrequenz und Blutdruck.

c) 1. Injektion 25 γ Doryl; 2. Injektion 50 mg 9295, nach 3 min 3. Injektion 25 γ Doryl. — Deutlich abgeschwächte Vasodilatation nach der 2. Dorylinjektion an Ohr und Finger. Gleiches Verhalten von Pulsfrequenz und Blutdruck.

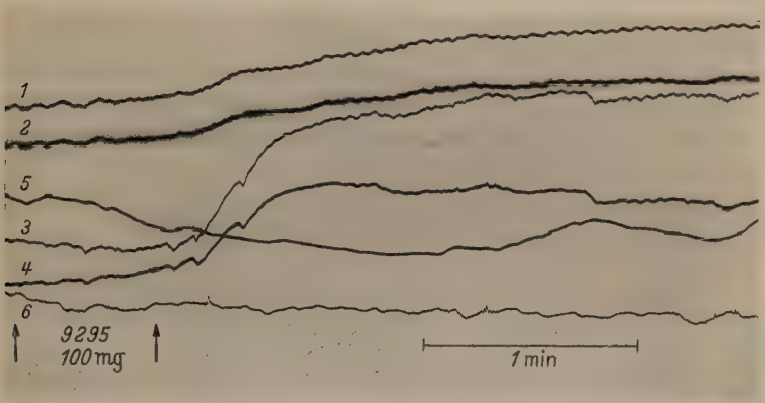


Abb. 3. Vp. H. H. Intraarterielle Injektion von 100 mg 9295 in 55 sec. — 1. Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen). 2. Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung). 3. Durchleuchtungskurve ultrarot (linke Großzehe) (Zehenvolumen). 4. Durchleuchtungskurve rot (linke Großzehe) (Volumen und O_2-Sättigung). 5. Ohrtemperatur. 6. Zehentemperatur (linke Kleinzehe).

Diese Versuche deuten daraufhin, daß der gefäßerweiternde Effekt dieser Vagusreizstoffe durch 9295 abgeschwächt wird, da 9295 bereits

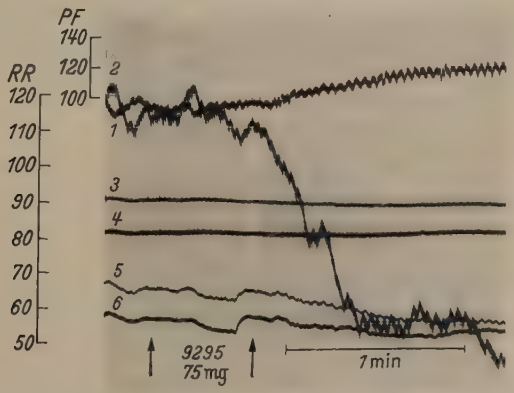


Abb. 4. Vp. A. St. — Intravenöse Injektion von 75 mg 9295 im Stehen in 30 sec. — 1. Pulsfrequenz. 2. Systol. Blutdruck. 3. Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen). 4. Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung). 5. Fingerdurchleuchtungskurve ultrarot (Fingervolumen). 6. Fingerdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung).

eine Mehrdurchblutung auslöst. Im Pulsfrequenz- und Blutdruckverhalten können keine deutlichen Veränderungen festgestellt werden.

6. Intravenöse Injektionen von 9295 bei der stehenden Versuchsperson (4 Versuche): In jedem Versuch mußte die Registrierung durch schnell eintretenden Kollaps unterbrochen werden (Abb. 4). Der systo-

lische Blutdruck sinkt rasch ab bei gleichzeitiger Tachykardie. An Ohr und Finger sehen wir eine verminderte Durchblutung. Die Wirkung des Präparates verhindert die Anpassungsvorgänge der arteriellen Strombahn an das verminderte Füllvolumen.

7. Bestimmung der physikalischen Kreislaufgrößen nach TEAB und 9295: Da die Kreislaufwirkung eines Medikamentes weitgehend von der vegetativen Ausgangslage des Organismus abhängig ist (Wezler[12]), interessierte uns die Frage, ob durch Beeinflussung der Schaltstellen

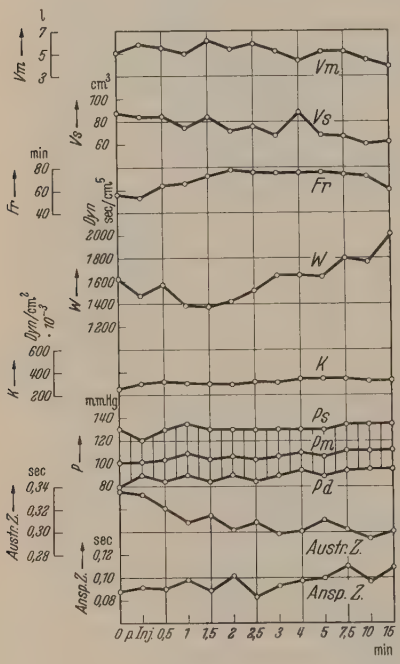


Abb. 5.

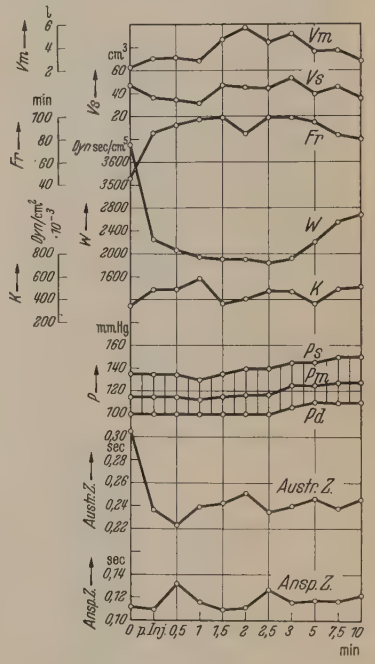


Abb. 6.

Abb. 5. Vp. Bi. — Intravenöse Injektion von 75 mg 9295. — Injektionsdauer: 20 sec. — *Vm* = Minutenvolumen. *Vs* = Schlagvolumen. *Fr* = Pulsfrequenz. *W* = Peripherer Strömungswiderstand. *K* = Volumelastizitätsmodul. *Ps* = Systolischer Blutdruck. *Pd* = Diastolischer Blutdruck. *Pm* = Mitteldruck. *Ansp. Z.* = Anspannungszeit. *Austr. Z.* = Austreibungszeit. — Zeit in Sekunden und Minuten.

Abb. 6. Vp. Ze. — Intravenöse Injektion von 400 mg TEAB. — Injektionsdauer: 2 min. — *Vm* = Minutenvolumen. *Vs* = Schlagvolumen. *Fr* = Pulsfrequenz. *W* = Peripherer Strömungswiderstand. *K* = Volumelastizitätsmodul. *Ps* = Systolischer Blutdruck. *Pd* = Diastolischer Blutdruck. *Pm* = Mitteldruck. *Ansp. Z.* = Anspannungszeit. *Austr. Z.* = Austreibungszeit. — Zeit in Sekunden und Minuten.

der vegetativen Regulationen charakteristische Veränderungen der physikalischen Kreislaufgrößen eintreten.

Die Abb. 5 und 6 mögen als Beispiele für diese Untersuchungen dienen. Während auf der Abb. 5 bei einer vorwiegend „sympathikotonen Ruhekreislaufeinstellung" eine Erhöhung des peripheren Strömungswiderstandes bei Abnahme des Schlag- und Minutenvolumens resultiert,

sehen wir auf Abb. 6 bei vorwiegend „vagotoner Ruhekreislaufeinstellung" ein Absinken des peripheren Strömungswiderstandes bei gleichzeitiger Zunahme des Schlag- und Minutenvolumens. Im Pulsfrequenzverhalten ergeben sich ebenfalls charakteristische Unterschiede, wie wir sie nach Injektion von Sympathikomimetika finden konnten (Mechelke und Meitner[13]. Bei niedriger Ruhepulsfrequenzlage erfolgte nach pharmakologischer Belastung eine sehr viel stärkere Zunahme der Herzschlagfolge als bei höherer Ruhepulsfrequenzlage.

Während in dem Versuch, den Abb. 5 wiedergibt, die Pulsfrequenz nach 120 sec eine maximale Zunahme um 21 Schläge pro Minute zeigt, erhöht sich die Herzschlagfolge in dem Versuch, den Abb. 6 wiedergibt,

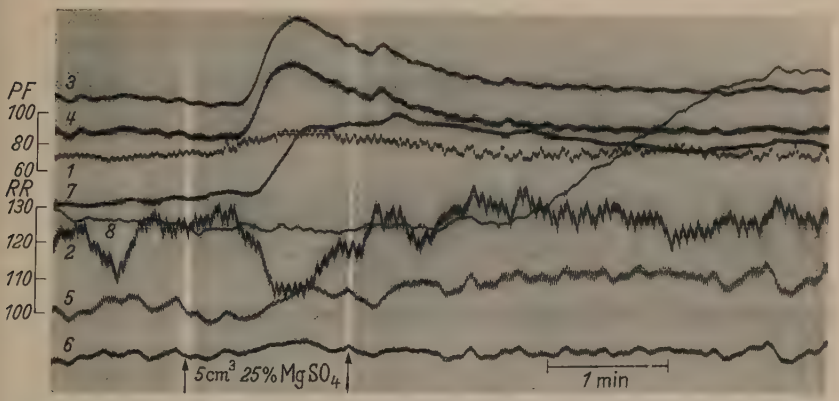


Abb. 7. Vp. F. H. — Intravenöse Injektion von 5 cm³ Magnesiumsulfat in 80 sec. — 1. Pulsfrequenz. 2. Systolischer Blutdruck. 3. Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen). 4. Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung). 5. Fingerdurchleuchtungskurve ultrarot (Fingervolumen). 6. Fingerdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2-Sättigung). 7. Ohrtemperatur. 8. Fingertemperatur.

um 55 Schläge pro Minute. Diese Untersuchungen bestätigen somit die Vermutungen, daß die ganglienblockierenden Medikamente vor allem den vorherrschenden vegetativen Tonus beeinflussen. Beim „vagotonen Kreislauf" wird durch Dämpfung der „vagotonischen Innervation" der Sympathikus in den Vordergrund treten, während beim „sympathikotonen Kreislauf" durch Dämpfung des Sympathikus ein Überwiegen des Vagotonus resultiert.

Die auf beiden Abbildungen ersichtliche Zunahme der Austreibungszeit dürfte vorwiegend durch die Pulsfrequenzzunahme bedingt sein. Die Anspannungszeit zeigt nur geringe Veränderungen. Die in einigen Versuchen festgestellte geringe Zunahme derselben findet ihre Erklärung durch die gleichzeitige Abnahme des Schlagvolumens bei erhöhter Frequenz.

Diese Veränderungen der physikalischen Kreislaufgrößen nach TEAB und 9295 werden durch die restlichen 8 Untersuchungen bestätigt.

8. Intravenöse Injektion von 5 cm³ 25%iger $MgSO_4$-Lösung: In allen Untersuchungen wurden übereinstimmende Veränderungen der registrierten Kreislaufgrößen festgestellt. Auf der Abb. 7 sehen wir, daß schon während der Injektion eine erhebliche Mehrdurchblutung am Ohr einsetzt mit geringer Aufbesserung der Sauerstoffsättigung des Blutes. Während der Injektion oder kurz danach können wir die gleichen Veränderungen auch am Finger beobachten. Die Temperaturen an Ohr und Finger nehmen zu. Mit der Mehrdurchblutung der Peripherie tritt ein geringer Abfall des systolischen Blutdruckes auf bei gleichzeitiger Beschleunigung der Herzschlagfolge. 1 min nach Injektionsende hat der systolische Blutdruck in allen Versuchen wieder seinen Ausgangswert erreicht und verbleibt auf demselben.

Subjektiv wurde von den Versuchspersonen schon während der Injektion ein Wärmegefühl im ganzen Körper (vorwiegend im Kopfbereich) angegeben. Bei Versuchspersonen, bei denen gastritische Schmerzen bestanden, verschwanden diese nach der Injektion für mehrere Stunden.

9. Beeinflussung der Vasomotorenreflexe durch 9295 (6 Versuche): Durch äußere Reize (Schreck, Schmerz, Kälte) und psychische Reize (Kopfrechnen) kann eine einförmige Kreislaufreaktion in Form einer Vasokonstriktion an der Hand bei gleichzeitiger vorübergehender Blutdrucksteigerung ausgelöst werden. Die gleiche Vasomotorenreaktion wird auch durch einen tiefen Atemzug hervorgerufen.

Die Leitung dieser Gefäßreflexe mit selektivem Ausbreitungsgebiet, die durch das Vasomotorenzentrum vermittelt werden, erfolgt über das autonome Nervensystem. Moe und Freyburger[2] stellten nach Gabe von TEAB ein Ausbleiben dieser Vasomotorenreaktion fest.

In unseren Versuchen fanden wir bei 4 Versuchspersonen ein Ausbleiben der Vasomotorenreaktion im Sinne der Vasokonstriktion unmittelbar nach Injektion von 9295. Bereits nach 3 min trat jedoch die Vasokonstriktion nach Reizwirkung in abgeschwächter Form wieder auf.

Zusammenfassung.

Es wird über Kreislaufwirkungen des TEAB, 9295 und des Magnesiumsulfates beim normalen Menschen berichtet. Nach diesen Medikamenten beobachtet man eine Mehrdurchblutung der Peripherie bei gleichzeitiger geringer Abnahme des systolischen Blutdruckes und Pulsfrequenzsteigerung. Die pressorische Adrenalinwirkung erscheint nach 9295 verstärkt bei ausgiebigerer Vasokonstriktion der Peripherie. Während der maximalen Blutdrucksteigerung wird eine anhaltende Erhöhung der Pulsfrequenz gefunden. Im Zusammenhang mit der Aufhebung der respiratorischen Arrhythmie kann diese Tatsache mit einer Hemmung

pressorezeptorischer Reflexe erklärt werden. Die gefäßerweiternde Wirkung des Doryl und Cholinchlorid wird nach 9295 abgeschwächt gefunden. Intraarterielle Injektion bewirkt eine besonders deutliche Mehrdurchblutung mit Aufbesserung der Sauerstoffsättigung, so daß ein Angriff der Medikamente am terminalen nervalen Endretikulum diskutiert werden kann.

Die Bestimmungen der physikalischen Kreislaufgrößen zeigen, daß in Abhängigkeit von der vegetativen Ausgangslage der vorherrschende vegetative Tonus durch die Medikamente gedämpft wird. Die Vasomotorenreaktion auf äußere und psychische Reize wird nach 9295 vorübergehend aufgehoben oder abgeschwächt.

Literatur.

[1] Bein, H. J., u. R. Meier: Experientia **1950**, 351. — [2] Moe, G. K., u. W. A. Freyburger: J. of Pharmacol. **98**, 4/II, 61 (1950). — [3] Heidelmann, G., H. Marx u. H. Hasse: Klin. Wschr. **1950**, 691. — Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg **1950**, 245. — [4] Stanbury, J.: J. of Pharmacol. **93**, 52 (1948). — [5] Hommer: Klin. Wschr. **1948**, 22. — [6] Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen mit fortlaufend registrierenden Methoden am gesunden Menschen. Stuttgart: Thieme-Verlag 1951. — [7] Broemser, Ph., u. O. F. Ranke: Z. Biol. **90**, 467 (1930). — [8] Wezler, K., u. A. Böger: Erg. Physiol. **41**, 292 (1939). — [9] Blumberger, Kj.: Arch. Kreislaufforschg **6**, 203 (1940). — [10] Matthes, K., u. Ebeling: Pflügers Arch. **250**, 747 (1948). — [11] Mechelke, K., u. H. J. Meitner: Z. Kreislaufforschg **38**, 268 (1949); **39**, 525 (1950). — [12] Wezler, K.: Organismus und Umwelt. S. 106. Dresden: Theodor Steinkopff 1939. — [13] Mechelke, K., u. H. J. Meitner: Arch. Kreislaufforschg **16**, 160 (1950).

Dr. K. Mechelke, Erlangen, Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 14—28 (1951).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. med. L. Lendle).

Versuche zum Nachweis exzitierender Wirkungen narkotischer Stoffe und Rauschgifte mit Hilfe des Elektroschockverfahrens.

Von
Josef Wolf.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Mai 1951.)

Narkotisch wirksame Stoffe zeigen in ihrem Wirkungsablauf vielfach auch zentralnervöse Erregungserscheinungen. Die bekannte Exzitationsphase im ansteigenden Teil der Inhalationsanästhesie, besonders deutlich in der Äthernarkose, wird ähnlich — wie dies Schmiedeberg[1] für die Alkoholerregung angab — als eine „Lähmung von Hemmungen" gedeutet.

Auch Schlafmittel können erregende Nebenwirkungen hervorrufen, besonders Mittel aus der Gruppe der Barbitursäurepräparate, die für Injektionsnarkosen Verwendung finden. So weiß man aus Tierversuch und klinischer Erfahrung, daß nach der schnellen Injektion auch geringer Dosen häufig Erregungszustände am Beginn eintreten oder in der abklingenden Phase wieder auftreten, so daß eine postnarkotische Überwachung des Patienten erforderlich werden kann. Gelegentlich beobachtet man bei solchen Narkosen auch bestimmte Formen von Nystagmus. Allgemein bekannt ist aus Tierversuchen die Hyperreflexie selbst im Stadium einer Narkose mit Aufhebung aller Körperstellreflexe (Silver[2]).

Besondere Erregungsformen treten bei Erholung aus der akuten Barbitursäurevergiftung am Menschen auf (Schoen[3]) und bei chronischem Schlafmittelmißbrauch. Polisch und Panse[4] haben diesen chronischen Schädigungen eine besondere Monographie gewidmet mit ausführlicher Darstellung der genannten Erregungszustände.

Auch bei vielen Rauschgiften muß wohl die Euphorie als eine Überlagerung von Erregung und Lähmung gedeutet werden. Im Interesse der einheitlichen Auffassung von Narkotika und Rauschgiften als lähmende Stoffe hat man im Anschluß an Schmiedeberg[1] die schon erwähnte Auffassung vertreten, auch diese Erregungserscheinungen seien nur die Folge von Lähmungen der Hemmungen. Gegen diese Auffassung sind aber schon viele Gegengründe aufgeführt worden.

Es scheint uns nun möglich, mit dem neuen Verfahren der Elektroschockprüfung im Tierversuch direkt den Erregungszustand des Zentralnervensystems zu prüfen, um diese verschiedenen Fragen neu experimentell aufzunehmen. Dieses Verfahren wird sonst vielfach geübt, um narkotische Wirkungen, insbesondere antiepileptische Wirkungsbedingungen tierexperimentell quantitativ zu prüfen.

Die geplanten Untersuchungen sollten sich hauptsächlich der exzitierenden Wirkung von Äther, Alkohol, einigen Barbitursäurepräparaten (Veronal, Pernocton) und verschiedenen Rauschgiften (Morphium, Kokain) widmen. Auch ähnlich wirkende Stoffe ohne ausgesprochene Rauschgiftwirksamkeit wurden zur Untersuchung herangezogen, so Psicain, Atropin und das neue Analgetikum Polamidon. Einige Versuche wurden auch mit Nikotin angestellt, dem teils erregende, teils lähmende Wirkungen von den Tabakrauchern zugeschrieben werden.

Bei dieser geplanten Untersuchung konnten auch frühere Experimente von Beckmann[5] (unveröffentlicht) wieder aufgenommen und nachgeprüft werden. Beckmann stellte bei chronischer Behandlung von Ratten mit Veronal und Phanodorm eine Steigerung der Krampferregbarkeit durch Cardiazol fest. Sie wollte damit beweisen, daß die chronische Wirkung von Barbitalen eine Neigung zu Erregungszuständen veranlassen kann, entsprechend den klinischen Erfahrungen von Polisch und Panse[4].

I. Methodik und allgemeine Versuchsbedingungen.

Als Maß für den zentralen Erregungszustand verwendeten wir die Elektrokrampfschwelle. Dabei hielten wir uns mit geringfügigen Änderungen an die Prinzipien, wie sie vor kurzem von Gerlich[6] für den Elektroschock an Meerschweinchen mitgeteilt worden sind. Als Stromquelle diente das Wechselstromnetz von 220 V und 50 Hz. Die Spannungsänderung erfolgte mittels eines Potentiometerwiderstandes von annähernd 10000 Ohm. Ein Vorwiderstand von 1000 Ohm sollte Änderungen des Kopfwiderstandes bei steigender Spannung bedeutungslos machen. Zur Bestimmung der Spannung diente ein Voltmeter. Als Elektroden wurden Messingkugeln von 0,8 cm Durchmesser verwendet, die mit Wildleder überzogen und dauernd mit Leitungswasser befeuchtet wurden. Die Auslösung des elektrischen Reizes erfolgte mittels eines Kontaktpendels. Die Reizzeit betrug in allen Fällen 0,6 sec. Die Prüfung wurde immer mit der gleichen unterschwelligen Anfangsspannung begonnen. Bei gleichem Potentialzuwachs von 5 V und gleichem Reizintervall von 30 sec. wurde die Krampfschwelle aufgesucht.

Als Versuchstiere wurden Ratten (110—180 g) verwendet. Der Ablauf des Elektrokrampfes an der Ratte zeigt große Ähnlichkeit mit dem an Meerschweinchen hervorgerufenen. Bei unterschwelligen elektrischen Reizen kommt es während des Stromdurchflusses von Schläfe zu Schläfe zu einem allgemeinen Tetanus, der dann infolge einer motorischen Rindenreizung von heftigen Bewegungen oder vereinzelten klonischen Zuckungen der Extremitäten gefolgt ist. Ist die Krampfschwelle erreicht, so geht der generalisierte Spasmus während des Stromflusses laufend in eine tonische Phase über, wobei sich die Tiere meist bogenförmig krümmen oder auch mit deutlichem Opisthotonus strecken. Bei einem Teil der Tiere überwiegt der Beugertonus, bei einem anderen der Streckertonus. Oft sind auch die vorderen Extremitäten gebeugt, während die Hinterbeine gestreckt werden. An diese tonische Phase, die etwa 5 sec dauert, schließt sich das mehr oder weniger

heftige klonische Stadium von etwa 10 sec Dauer an. Bei einigen Tieren kommt es dabei nur zu wenigen klonischen Zuckungen, während andere außerordentlich heftige Bewegungen zeigen und fluchtartig davonrennen. Während der tonischen Phase steht die Atmung still, wogegen sie im klonischen Stadium langsam in Form der Preßatmung wiederkehrt. Anschließend fällt das Tier in einen komatösen, erregungslosen Zustand, wobei es Seiten- und Rückenlage einnimmt. Einzelangaben über Versuchsbedingungen vgl. bei Wolf[7].

II. Vorversuche.

Um pharmakologische Wirkungen auf die Elektroschock-Reaktion zu beurteilen, mußten zunächst die Erregbarkeitsbedingungen an nichtbehandelten Tieren, und zwar am selben Tier, wiederholt oder auch an verschiedenen Individuen unter denselben Bedingungen kontrolliert werden. Die Streuung der Empfindlichkeit verschiedener Tiere ist verhältnismäßig gering.

An 414 Ratten, die gleichzeitig im Institut eingestellt wurden, fanden wir eine durchschnittliche Schwelle für den Elektroschock von 70 Volt bei einer Standardabweichung von $\pm$ 12 Volt.

In einer Reihe von 10 Ratten wurde in stündlichen Abständen (ohne gleichzeitige Zufuhr von Pharmaka) die Schockgrenze ermittelt. Es wurden folgende durchschnittliche Änderungen der Krampfschwelle gegenüber dem Ausgangswert gefunden:

nach	30	min	+ 1 V
„	90	„	+ 2 V
„	150	„	+ 5 V
„	210	„	+ 1 V

In einem 2. Versuch wurde eine Gruppe von 10 Tieren im Rahmen eines Dauerversuches in einem Zeitraum von 6 Wochen wöchentlich je einmal geschockt. Es wurden folgende durchschnittliche Änderungen der Krampfschwelle gefunden:

nach	1	Woche	+ 4 V
„	2	Wochen	— 1 V
„	3	„	0 V
„	4	„	— 2 V
„	5	„	— 3 V
„	6	„	— 1 V

In beiden Versuchen zeigte es sich also, daß bei Ratten die Elektrokrampfschwelle für jedes Tier feststehend ist und nur eine geringe Schwankungsbreite hat.

In einem weiteren Vorversuch wollten wir feststellen, ob mit dem Elektrokrampfverfahren überhaupt eine Erregbarkeitssteigerung des Zentralnervensystems nachgewiesen werden kann.

Wir untersuchten daher die Wirkung verschiedener Dosen Cardiazol bei subkutaner Applikation auf die Elektrokrampfschwelle von Ratten. Die Ausgangswerte der Krampfschwelle wurden jeweils 1 Std vor der

Injektion ermittelt. 15, 45 und 105 min nach der Kardiazol-Injektion erfolgten dann die weiteren Krampfauslösungen. Es ergaben sich dabei durchschnittlich Senkungen der Krampfschwelle über 10 Volt ab Cardiazoldosierungen von 27 mg/kg, also noch deutlich unter der Krampfschwellendosierung von Cardiazol (40—50 mg/kg). Diese erhöhte Krampfbereitschaft hielt etwa 45 min an. Man kann also mit diesem Verfahren des Elektroschocks grundsätzlich eine erhöhte Krampfneigung feststellen. Noch viel deutlichere Erhöhungen hatte übrigens Gerlich[6] schon beim Meerschweinchen unter der Behandlung mit Schilddrüsenpräparaten beobachtet.

III. Versuche mit Narkotika.

A. Äthylalkohol.

Wir prüften an Ratten vorwiegend kleine Alkoholdosen. Die Verabfolgung geschah subkutan als 5%ige Lösung. Nach Lendle[8] liegt die vollnarkotische Dosis an Ratten bei 4,5 cm³/kg und die tödliche Dosis bei 8,0 cm³kg. Unsere höchste Dosierung war $^1/_5$ und die niedrigste $^1/_{20}$ der vollnarkotischen Dosierung. Die Ausgangswerte der Krampfschwelle wurden jeweils 1 Std vor der Injektion ermittelt. Nach der Injektion erfolgte die Krampfauslösung in ½stündlichen Intervallen für einen Zeitraum von 2 Std. Zur Kontrolle wurden 5 Tiere den gleichen Versuchsbedingungen unterworfen, ohne daß ihnen Alkohol verabfolgt worden war.

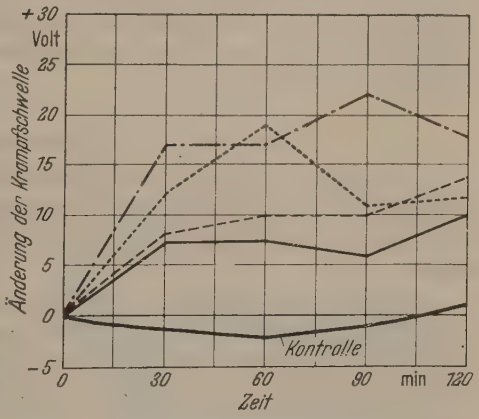


Abb. 1. *Alkoholversuche.* Die Kurven bieten Durchschnittswerte von 5 Ratten. Änderung der Krampfschwelle in Volt. ——— = 0,2 cm³/kg; — — — 0,3 cm³/kg; . . . = 0,5 cm³/kg; · – 1,0 cm³/kg; —— = Kontrolle.

Abb. 1, welche die Mittelwertskurven für je 5 Tiere wiedergibt, zeigt folgende Ergebnisse: In den Dosierungen 0,2 und 0,3 cm³/kg zeigte sich eine geringe Erhöhung der Krampfschwelle, die auch nach 2 Std noch nicht abgeklungen war, sondern im Gegenteil dann erst ihren höchsten Wert für den Untersuchungszeitraum erreichte. Auf eine länger dauernde Untersuchung wurde verzichtet, da nach diesem Zeitpunkt eine Exzitation nicht mehr zu erwarten war. Bei einer Dosierung von 0,5 und 1,0 cm³/kg kam es zu einer stärkeren Erhöhung der Krampfschwelle, die nach 1 bzw. 1½ Std ihr Maximum erreichte, um dann wieder allmählich abzufallen. Die Tiere waren in ihrem Verhalten nicht wesentlich verändert, auch das Elektrokrampfbild zeigte nichts Auffallendes. Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß bei den obigen Versuchen keinerlei auch nur angedeutete

Krampfschwellensenkung als Zeichen einer Erregbarkeitssteigerung beobachtet werden konnte, auch nicht in der ersten Phase der Wirkung.

B. Äther.

Wir untersuchten das Verhalten der Elektrokrampfschwelle von Ratten unter der Einwirkung von Äther im Stadium der Exzitation. Zu diesem Zwecke wurde das betreffende Versuchstier 1 Std nach der Bestimmung der normalen Krampfschwelle in eine Narkoseflasche mit einem Fassungsvermögen von 7 l gesetzt, in der abgemessene Äthermengen verdampft wurden.

Je nach der verwendeten Äthermenge geriet das Tier nach einer Zeit von 2—5 min in einen erhöhten Erregungszustand, der sich dadurch äußerte, daß sich das Tier nach der vorangegangenen unauffälligen Phase torkelnd aufrichtete, taumelnd im Kreise lief oder in halber Seitenlage unkoordinierte Bewegungen mit den Extremitäten ausführte. In diesem Zustand wurde das Tier schnellstens aus der Narkoseflasche genommen und in der Elektroschockvorrichtung fixiert. Sofort wurde mit der Prüfung der Elektrokrampfschwelle begonnen. Trotz des äußerlich auffallenden Erregungszustandes der Ratte war nicht das geringste Absinken der Krampfschwelle festzustellen. Im Gegenteil, es war in diesem ersten Narkosestadium eine beträchtliche Erhöhung der Schockschwelle, also eine Minderung der Krampferregbarkeit eingetreten. Die mittlere Krampfschwelle bei 5 untersuchten Ratten war von 73 auf 114 Volt angestiegen.

C. Barbitursäuren.

Wir prüften die Erregbarkeitsverhältnisse mittels des Elektroschockverfahrens im Verlaufe akuter Barbitursäurewirkungen und während einer langen Periode der Zufuhr solcher Mittel in verschiedenen Dosierungen.

a) Akute Barbitursäurewirkung. 1 Std nach Einstellung der Schockempfindlichkeit erhielten die Ratten Veronalnatrium intraperitoneal oder Pernocton subkutan. Mit der Erregbarkeitsprüfung wurde 30 min später begonnen. Alle 60 min danach erfolgte eine neue Einstellung. Die anfängliche Reizschwelle betrug 40 V. Alle folgenden Angaben sind Mittelwerte aus je 5 Tierversuchen (Abb. 2 u. 3).

Bei den Veronaldosierungen 10 mg/kg und 30 mg/kg kam es zu einer geringfügigen Erhöhung der Krampfschwelle, die bereits nach ½ Std ihr Maximum erreichte, um von da ab wieder allmählich zum Anfangswert abzusinken. Bei diesen niedrigen Dosierungen waren die Tiere in ihrem Verhalten äußerlich nicht verändert, es zeigte sich weder ein narkotischer noch ein exzitierender Effekt. Auch das Elektrokrampfbild zeigte keine Besonderheiten. Bei den höheren Dosierungen von 60 mg/kg und 150 mg/kg stieg die Krampfschwelle erheblich an, erreichte aber erst nach 2½ Std ihr Maximum und fiel hierauf wieder kontinuierlich ab. Bei den Tieren machte sich besonders nach der

höchsten Dosierung eine deutliche narkotische Wirkung bemerkbar. Bereits nach 15 min trat Seitenlage ein, wobei die Tiere aber noch versuchten, das Vorderteil zu drehen. Schmerz- und Kornealreflex waren noch vor-

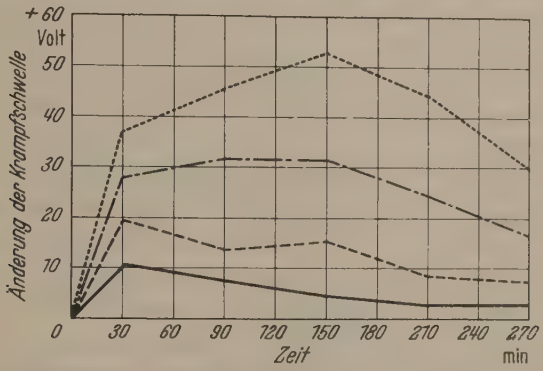


Abb. 2. *Veronalversuche.* Die Kurven bieten Durchschnittswerte von 5 Ratten. Änderung der Krampfschwelle in Volt. ——— = 10 mg/kg; — — — 30 mg/kg; —·— = 60 mg/kg; ------- = 150 mg/kg.

handen. Dieses Narkosestadium währte ungefähr 4 Std. Bei 2 Tieren trat nach Ablauf dieser Zeit Zittern am ganzen Körper ein. Sonstige Zeichen einer Erregung waren nicht festzustellen. Das Elektrokrampfbild zeigte die üblichen Veränderungen, die bei narkotisch wirkenden Stoffen einzutreten pflegen: Die klonischen Krämpfe nahmen erheblich ab und verschwanden schließlich ganz, und auch die tonischen Krämpfe ließen an Intensität nach. Nach ungefähr 4 Std, nachdem also die äußerlich feststellbare Narkose abgeklungen war, kam auch das ursprüngliche Elektrokrampfbild wieder zum Vorschein. In dem vorliegenden Versuchsablauf war also wiederum zu keinem Zeitpunkt irgendeine Erhöhung der Krampfbereitschaft festzustellen. Auch bei den beiden Tieren, bei denen während des Versuches das erwähnte Muskelzittern eintrat, lag die Elektrokrampfschwelle noch erheblich über dem Ausgangswert.

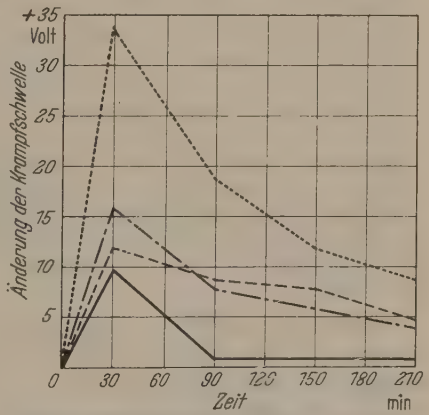


Abb. 3. *Pernoctonversuche.* Die Kurven bieten Durchschnittswerte von 5 Ratten. Änderung der Krampfschwelle in Volt. ——— = 3 mg/kg; — — = 5 mg/kg; —·— = 10 mg/kg; ----- = 30 mg/kg.

Es war nun noch zu prüfen, ob nicht in einer noch späteren Periode des Abklingens der Barbitursäurewirkung Erregungserscheinungen in Form einer Senkung der Elektrokrampfschwelle manifest würden. Wie aus der obigen Abbildung

ersichtlich ist, ist ja besonders bei den höheren Dosierungen noch 4½ Std nach der Injektion ein deutlicher narkotischer Effekt vorhanden. Zu diesem Zwecke wurden probeweise 3 Ratten, die mit der höchsten Dosis von 150 mg/kg Veronal behandelt worden waren, erst 13 und 18 Std nach der Injektion geschockt. Zu diesem Zeitpunkt aber hatte die Elektrokrampfschwelle ihren Ausgangswert wieder erreicht, ein Absinken unter denselben war zu diesem Zeitpunkt nicht festzustellen. Nun trat noch die Frage auf, ob nicht zum Zeitpunkt der ersten Elektroschockierung, also ½ Std nach der Injektion, die erregende Wirkung bereits wieder abgeklungen war. Deshalb wurden probeweise 3 Ratten, die eine Dosis von 150 mg/kg Veronal erhalten hatten, bereits 10 min nach der Injektion geschockt. Aber auch schon nach dieser kurzen Zeit war die Krampfschwelle stark angestiegen und zwar von einem mittleren Ausgangswert von 53 V auf eine durchschnittliche Schockschwelle von 78 V. Damit hatte sich also gezeigt, daß auch unmittelbar nach der Injektion von Veronal keine erhöhte Krampfbereitschaft an Ratten festzustellen ist.

Ähnliche Befunde ergaben auch unsere Versuche mit Pernocton. Bei allen Dosierungen trat eine Erhöhung der Krampfschwelle ein, deren Maximum jeweils schon ½ Std nach der Injektion erreicht wurde. Die Kurve entspricht also dem Wirkungsablauf des Pernoctons als Narkosemittel. Die Tiere zeigten bei den niedrigen Dosierungen abgesehen von einer gewissen Stumpfheit und Bewegungsarmut nichts Auffälliges. Erst in der höchsten Dosierung von 30 mg/kg trat eine stärkere narkotische Wirkung ein. Erregungserscheinungen, wie sie von Haas und Zipf[9] an weißen Mäusen beobachtet worden waren, konnten bei unseren Dosierungen nicht festgestellt werden. Wohl aber zeigte sich übereinstimmend mit Silver[2] während der leichten Narkose eine gesteigerte Reaktionsfähigkeit auf selbst geringe schmerzhafte Reize.

b) Chronische Barbitursäurewirkung. Eine einheitliche Tierlieferung wurde in 4 Gruppen zu je 5 Tieren geteilt. Alle Tiere waren besonders gezeichnet, um Verwechslungen zu vermeiden. Die 1. Gruppe erhielt eine tägliche Dosis von 50 mg/kg Veronal, die 2. Gruppe 100 mg/kg Veronal und die 3. Gruppe 20 mg/kg Pernocton. Die Tiere der 4. Gruppe dienten als Kontrolle und wurden nicht mit Schlafmitteln behandelt. Die Versuchsdauer wurde auf 6 Wochen ausgedehnt. Die Bestimmung der Krampfschwelle wurde wöchentlich einmal jeweils am gleichen Wochentage durchgeführt.

Pernocton 20 mg/kg hatte keinerlei Einfluß auf die Krampfschwelle. Auch die Veronaldosis 50 mg/kg führte nur vorübergehend zu einer Senkung der Schwelle (— 7 Volt). Die Veronaldosis 100 mg/kg führte aber nach einer anfänglichen geringen Erhöhung von der 4. Woche ab zu einer mäßigen Senkung der Krampfschwelle (— 17 Volt). Die Tiere vertrugen diese Schlafmittelbehandlung relativ gut, größere Gewichtsabnahmen traten nicht ein. Trotzdem starben während des Versuches 2 Tiere, die wahrscheinlich durch die dauernde Schlafmittelwirkung geschwächt interkurrenten Krankheiten erlagen. Das Verhalten der Tiere änderte sich kaum während des Versuches, Erregungserscheinungen irgendwelcher Art waren nicht zu beobachten. Nach Abschluß dieses Versuches wurde den 5 Ratten, die mit 20 mg/kg Pernocton

behandelt worden waren, weiterhin täglich dieses Narkotikum verabfolgt. Die Dosis wurde auf 30 mg/kg erhöht und die Versuchsdauer um weitere 7 Wochen verlängert. Auch diese erhöhte Pernoctondosis hatte zunächst wenig Einfluß auf die Krampfschwelle und erst von der 11. Versuchswoche ab kam es zu einer mäßigen Senkung (— 7 Volt). Leider starb auch während dieses fortgeführten Versuches 1 Tier, so daß der Mittelwert (— 14 Volt) in der 13. Woche sich aus 4 Versuchen berechnet.

In einem 3. Dauerversuch sollte nun eine noch höhere Veronaldosis zur Anwendung kommen. Zu diesem Zweck wurden 10 neue Ratten

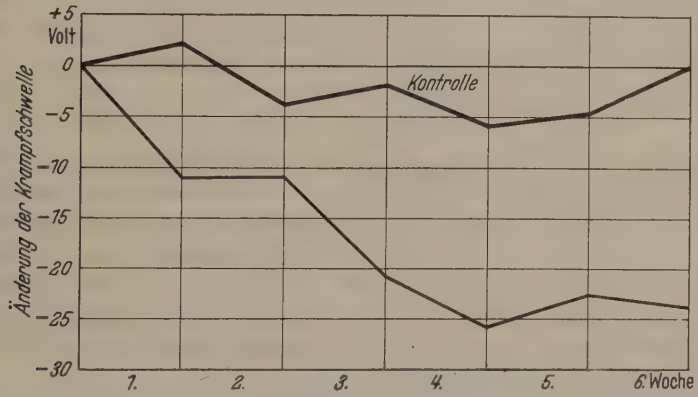


Abb. 4. *Veronal-Dauerversuch.* Die Kurven bieten Durchschnittswerte von 5 Ratten. Änderung der Krampfschwelle in Volt. ——— 150 mg/kg Veronal täglich subkutan; ——— = Kontrolle.

ausgesucht, von denen 5 als Kontrolltiere dienten, während die anderen mit einer täglichen Dosis von 150 mg/kg Veronal behandelt wurden. Entsprechend dem 1. Versuche wurde auch hier die Versuchsdauer auf 6 Wochen festgesetzt. Wie die obenstehende Abb. 4 zeigt, kommt es bereits nach 3 Wochen zu einer beträchtlichen Krampfschwellensenkung, die sich in der 2. Versuchshälfte noch weiter verstärkt. Bei den Tieren war also eine deutliche Erregbarkeitssteigerung eingetreten. Trotzdem hatte sich aber ihr äußerliches Verhalten nicht wesentlich verändert, auch hier kam es zu keinen sichtbaren Erregungserscheinungen.

IV. Versuche mit Alkaloiden, Rauschgiften und Analgetika.

A. Morphin.

Wir prüften an je 5 Ratten steigende Morphindosen (1—30 mg/kg subkutan) auf Änderungen der Krampferregbarkeit. Abb. 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Es zeigten sich nur lähmende Wirkungen, besonders in den höheren Dosierungen ab 10 mg/kg. Sie erreichten in 45 min ihren Gipfel.

Sichtbare Erregungserscheinungen in Form von rauschartigem Herumtorkeln oder Muskelzittern wurden nur ganz vereinzelt bei der höchsten Dosierung beobachtet. Auch in diesem Zustande lag die Krampfschwelle weit über dem Ausgangswert. Im allgemeinen war bei den Tieren eine gewisse Stumpfheit und Bewegungsarmut festzustellen. Das bekannte „Schwanzphänomen" war bei allen Dosierungen schon kurze Zeit nach der Injektion vorhanden. Das Elektrokrampfbild zeigte keine Besonderheiten.

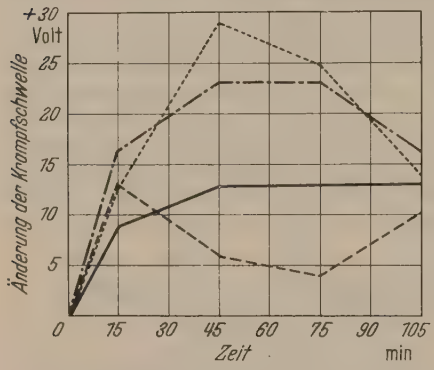


Abb. 5. *Morphinversuche.* Die Kurven bieten Durchschnittswerte von 5 Ratten. Änderung der Krampfschwelle in Volt. ——— = 1 mg/kg; — — = 3 mg/kg; —·— = 10 mg/kg; ------- = 30 mg/kg.

B. Kokain.

Kokain wurde an je 5 Ratten in 4 verschiedenen Dosierungen subkutan verabreicht. Abb. 6 zeigt die Ergebnisse. Man sieht, daß sämtliche Kokaindosierungen zu einer Erhöhung der Krampfschwellen führen, die besonders bei 100 mg/kg beträchtlich ist. Es steht also ein erregbarkeitsmindernder Effekt im Vordergrund des Wirkungsbildes, eine erregende Komponente konnte mit unseren Methoden und Dosierungen nicht nachgewiesen werden.

Bei den Tieren kam es besonders nach den beiden höchsten Dosen etwa 1 Std nach der Injektion zu motorischer Unruhe und zu sonderbaren Pendel- und Drehbewegungen des Kopfes. Trotz dieser Zeichen offensichtlicher Erregung war die Krampfschwelle jeweils stark erhöht.

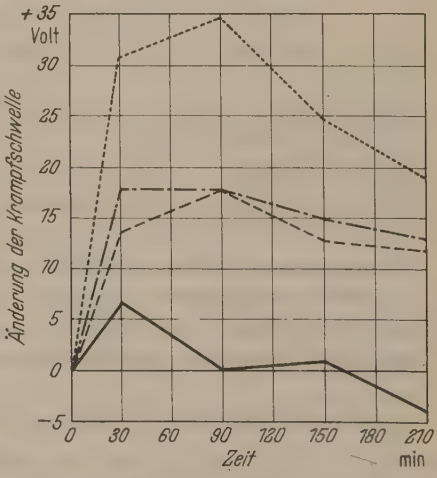


Abb. 6. *Kokainversuche.* Die Kurven bieten Durchschnittswerte von 5 Ratten. Änderung der Krampfschwelle in Volt. ——— = 10 mg/kg; — — 30 mg/kg; —·— = 50 mg/kg; ------- = 100 mg/kg.

Auch das Elektrokrampfbild zeigte einige Besonderheiten: Nach der Injektion des Kokains war es nicht mehr möglich, einen typischen Elektrokrampf mit seinen drei gut unterscheidbaren Phasen auszulösen, vielmehr kam es jeweils zu einem mehr oder weniger atypischen Verlauf desselben. Während die tonische Phase außerordentlich

kurz war oder überhaupt fehlte, beherrschte die klonische Phase das Krampfbild. Der Klonus war sehr heftig und lang anhaltend und pflegte meist in Schreikrämpfe überzugehen. Die komatöse Phase war meist von kurzer Dauer.

C. Psicain.

Aus der Gruppe der synthetischen Kokainersatzstoffe sollte das Psicain untersucht werden, dem das „Rechtskokain", eine optische d-Form der stereoisomeren Pseudoreihe, zugrunde liegt. Auch diese Ersatzpräparate haben neben ihrer lokalanästhetischen Wirkung eine resorptive Wirkung auf das Zentralnervensystem. Jedoch ist allen Kokainersatzstoffen gemeinsam, daß ihnen die Rauschkomponente fehlt und deshalb keine Suchtgefahr bei ihrer Verwendung besteht.

Wie beim Kokain führten alle geprüften Dosen nur zu einer Erhöhung der Krampfschwelle, beginnend mit 50 mg/kg, besonders mit 100—150 mg/kg (+ 25 Volt und mehr). Die Wirkung klang in 3½ Std ab und erreichte ihren Gipfel in 1—1½ Std.

Erregungserscheinungen bei den Tieren, wie wir sie im Kokainversuch beobachtet hatten, traten diesmal nicht auf. Das Elektrokrampfbild glich jedoch weitgehend dem der Kokainversuchsreihe Auch hier war die heftige und lang anhaltende klonische Phase vorherrschend.

An dieser Stelle sei auf die Elektroschockversuche mit *Novocain* hingewiesen, die Gerlich[10] an Meerschweinchen durchführte. Danach kommt es auch nach Novocain zu einer, wenn auch nicht lange anhaltenden Herabsetzung der Krampferregbarkeit. So führt z. B. die Dosierung 150 mg/kg zu einer durchschnittlichen Erhöhung der Krampfschwelle um 40 V, während 50 mg/kg praktisch noch keine Wirkung hervorrufen.

D. Atropin.

Nach den bisherigen Erfahrungen, die wir bei der Untersuchung von Kokain und Psicain gemacht hatten, war nicht damit zu rechnen, daß wir bei Atropin grundsätzlich andere Versuchsergebnisse erzielen würden. Wir untersuchten die Wirkung von Atropin orientierend in den Dosierungen von 1 mg, 3 mg, 10 mg und 30 mg an je 2 Tieren. Auch hier konnten wir in keinem einzigen Falle eine Senkung der Krampfschwelle unter den Ausgangswert beobachten. Aber auch einen lähmenden Effekt in Form einer Krampfschwellenerhöhung konnten wir bei den zur Untersuchung gelangenden Dosierungen nicht feststellen. Die Krampfschwellen hielten während der ganzen Versuchsdauer mit auffallender Konstanz ihre Ausgangswerte bei.

In einzelnen Fällen traten kurz nach der Injektion stärkere Exzitationserscheinungen auf: Es kam zu Drehbewegungen, motorischer Unruhe, Muskelzittern und in einem Falle zu spontanen klonischen Krämpfen. Eine Prüfung ergab, daß auch während dieses Erregungs-

zustandes die Elektrokrampfschwelle der betreffenden Tiere *nicht* abgesunken war. Das Elektrokrampfbild war bei diesen Versuchen nicht wesentlich verändert.

E. Versuche mit Polamidon.

Dieses neue Analgetikum besitzt keine chemische Verwandtschaft mehr zu den Opiaten. Seine schmerzlindernde Wirksamkeit ist etwa doppelt so groß wie die des Morphins. Polamidon soll keine primäre Euphorie und Sucht veranlassen. Motorische oder psychische Exzitationserscheinungen fehlen im Wirkungsbild des Polamidon.

Wir prüften die Beeinflussung der Elektroschockschwelle durch steigende Dosen an je 5 Ratten. Wie Abb. 7 zeigt, führen alle 4 Dosierungen zu einer mäßigen Erhöhung der Krampfschwellen. Die Wirkung der einzelnen Dosen ist nicht wesentlich voneinander verschieden, so daß die Kurven zum mindesten in ihrem Anfangsteil dicht beieinander liegen. Diese Ergebnisse zeigen also nicht eine stufenweise Lähmung mit fortschreitender Dosis, wie man es bei einem echten Narkotikum erwarten kann. Eine Steigerung der Krampferregbarkeit konnte während des Versuches nicht beobachtet werden. Bei den beiden höchsten Dosierungen machte sich ½ Std nach der Injektion bei den Tieren ein eigentümlicher Starrezustand bemerkbar, der etwa 3 Std anhielt. Auch die Schwanzmuskulatur war daran beteiligt, so daß es zu einem ähnlichen Schwanzphänomen wie bei Morphin kam. Auf einen Reiz hin setzten sich die ataktischen Tiere in Bewegung und zeigten dabei einen sonderbaren, langsamen, spastischen Gang. Kornealreflex und Schmerzempfindung waren zu diesem Zeitpunkt erloschen.

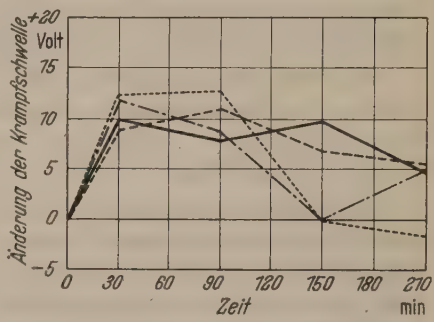


Abb. 7. *Polamidonversuche.* Die Kurven bieten Durchschnittswerte von 5 Ratten. Änderung der Krampfschwelle in Volt. ——— = 1 mg/kg; – – – = 3 mg/kg; —·—·— = 10 mg/kg; ------ = 30 mg/kg.

Das Elektrokrampfbild zeigte unter Polamidoneinwirkung keine Veränderungen.

F. Versuche mit Nikotin.

Raucher schreiben dem Nikotin teils anregende, teils beruhigende Eigenschaften zu. Diese nach- oder nebeneinander erregenden und lähmenden Wirkungen des Nikotins kennt man auch aus seinem Verhalten an vegetativen Ganglien und aus dem Vergiftungsbild.

Es sollte nur in einigen orientierenden Versuchen mit dem Elektroschockverfahren geprüft werden, ob sich eine Erregung nachweisen läßt. Für die Dosis

0,5 mg/kg wurden 2 Ratten und für die Dosen 1 mg/kg und 2 mg/kg je 3 Ratten verwendet. Die Versuchsbedingungen wurden dabei etwas abgeändert, da gleichzeitig auch das Phänomen der „Tachyphylaxie" untersucht werden sollte: Wenn nämlich Ratten eine krampfauslösende Dosis Nikotin verabfolgt worden ist, so kann an diesen Tieren 30—60 min später durch dieselbe Dosis kein Krampf mehr ausgelöst werden (Lendle und Ruppert[11].)

Die normalen Krampfschwellenwerte wurden wieder 1 Std vor der Injektion ermittelt. Da die exzitierende Wirkung des Nikotins an Ratten bereits wenige Minuten nach der Injektion in Erscheinung tritt, erfolgte die nächste Krampfauslösung schon 5 min nach der subkutanen Injektion. 1 Std später wurde erneut die Krampfschwelle bestimmt und wieder 30 min später erfolgte die 2. Injektion mit der gleichen Dosis, worauf dann nach 5 min die letzte Krampfschwellenbestimmung vorgenommen wurde.

Bei der Dosis 2 mg/kg bekamen die Ratten etwa 2 min nach der Injektion spontane klonische Krämpfe. Die Prüfung der Elektrokrampfschwelle, die sofort erfolgte, ergab, daß diese nur ganz minimal abgesunken war. Nach einer weiteren Stunde hatten sich die Werte kaum geändert. Nach der 2. Injektion, die zu keinem Krampf mehr führte, war die Senkung der Krampfschwelle noch geringer. Zu ähnlichen Ergebnissen führten die niedrigeren Dosierungen, bei denen es zu keinen Krämpfen, sondern nur zu starken motorischen Erregungserscheinungen kam. Hier behielten die Krampfschwellen entweder stets ihre Ausgangswerte bei oder sanken nur ganz geringfügig ab.

Das auffallende Merkmal dieser Versuche war also der offensichtliche Widerspruch zwischen stark erhöhter Krampfbereitschaft und nur geringfügig gesenkter Elektrokrampfschwelle.

V. Zur Frage des verschiedenen Angriffspunktes von Elektroschock und Cardiazolkrampf.

Ein Überblick über die vorliegenden Versuche zeigt, daß außer bei den Versuchen mit chronischer Barbitursäureverabfolgung und nach Cardiazol bei keinem der zur Untersuchung gelangenden Stoffe mittels des Elektroschockverfahrens eine erregende Wirkungskomponente festgestellt werden konnte. Nicht jede Exzitationserscheinung muß also mit einer erhöhten Bereitschaft für Elektrokrampfanfälle einhergehen. Ein treffendes Beispiel dafür bietet das Antiepileptikum Dilantin (Zentropil). Dieser Stoff, der in der Therapie der Epilepsie Verwendung findet, hemmt in starkem Maße die Erzeugung von Elektrokrampfanfällen, begünstigt aber die Auslösung von Cardiazolkrämpfen (P. Gley[12]). Diese merkwürdige Tatsache ist nur so zu erklären, daß das Dilantin neben seiner krampfhemmenden Wirkung auch eine erregende Komponente besitzt, die in subkortikalen Zentren wirksam wird, an denen nach Untersuchungen von Schoen[13] und Winniwarter[14] auch das Cardiazol hauptsächlich angreift. Diese erregende Teilwirkung des

Dilantins, die übrigens nach Stähli[15] im Laufe einer längeren Behandlung in Form von Übererregbarkeitserscheinungen zutage tritt, kann also mit dem Elektroschockverfahren überhaupt nicht erfaßt werden, da die lähmende Komponente auf den Kortex, das Hauptangriffsgebiet des Elektrokrampfes, im Vordergrund der Wirkung steht. An das Vorliegen ähnlicher Verhältnisse muß auch bei den von uns untersuchten Stoffen gedacht werden. Besonders in den Fällen, wo die Diskrepanz zwischen deutlichen Erregungserscheinungen und verminderter Bereitschaft für Elektrokrampfanfälle offensichtlich wurde, liegt die Annahme nahe, daß diese Exzitationssymptome von tieferen Zentren ausgehen, während eine gleichzeitig lähmende Komponente die Hirnrinde für elektrische Reize unempfindlich macht.

Wenn wir auch zu Beginn unserer Versuche feststellten, daß Cardiazol die Elektrokrampfschwelle in mäßigem Grade senkt, so mußte es doch einigermaßen in Erstaunen setzen, daß dieses starke Krampfgift dies nicht in viel auffälligerem Maße tat. Es ist dies ein weiteres Zeichen dafür, daß mit dem Elektrokrampfverfahren Erregungserscheinungen tieferer Zentren — das Cardiazol greift, wie schon erwähnt, hauptsächlich an subkortikalen Zentren an — nicht erfaßt werden können.

Nach dieser Erkenntnis ist es natürlich auch unmöglich, die Streitfrage zu entscheiden, ob es sich bei den Erregungssymptomen, die durch die vorliegenden Stoffe hervorgerufen werden, nur um eine Folge von Hemmungslähmungen handelt, oder ob sie durch direkte Erregung bestimmter Zentren des Zentralnervensystems zustande kommen.

Bei chronischer Barbitursäurevergiftung jedoch macht sich die erregende Komponente der Schlafmittel nicht nur in einer erhöhten Bereitschaft für Elektrokrampfanfälle bemerkbar, sondern auch in einer erhöhten Cardiazolempfindlichkeit. Es muß sich hier also sowohl um eine Erregbarkeitssteigerung subkortikaler als auch kortikaler Zentren handeln.

Diese erhöhte Cardiazolempfindlichkeit hatte Beckmann[5] früher beschrieben, aber ihre Befunde noch mit kritischen Vorbehalten ausgewertet. Ein Teil unserer eigenen Versuchstiere (vgl. Abb. 4) wurde unter chronischer Veronalbehandlung (150 mg/kg täglich 6 Wochen lang) neben der Schockempfindlichkeit auch auf Cardiazolkrampfbereitschaft geprüft.

	Versuchstiere (5 Ratten)	Kontrolltiere (5 Ratten)
Cardiazol-Krampfdosis vor Beginn des Versuches	45 mg/kg	45 mg/kg
Cardiazol-Krampfdosis nach 6 Wochen .	33 mg/kg	42 mg/kg

Während also die Krampfdosis bei den Kontrolltieren mit 42 mg/kg ziemlich unverändert war, krampften die Versuchstiere bereits alle bei einer Cardiazoldosis von 33 mg/kg. Es war also bei diesen im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine deutliche Cardiazol-Überempfindlichkeit eingetreten.

Einen zweiten derartigen Cardiazolversuch machten wir an den Ratten der Pernocton-Reihe (s. S. 20). Diese Tiere waren allerdings schon 6 Wochen mit 20 mg/kg Pernocton täglich vorbehandelt worden, als zum erstenmal ihre Cardiazolempfindlichkeit geprüft wurde. Wir erhielten eine Cardiazol-Krampfdosis von 33 mg/kg. Nach der weiteren 7wöchigen Versuchsdauer mit einer täglichen Verabreichung von 30 mg/kg Pernocton krampften die Tiere bereits bei einer Cardiazoldosis von 27 mg/kg.

Zusammenfassung.

1. Es wurde im Tierversuch geprüft, ob sich mittels des Elektroschockverfahrens als Bestimmungsmethode für die Krampferregbarkeit eine erregende Komponente im Wirkungsablauf verschiedener Arzneistoffe nachweisen läßt. Wir untersuchten den Einfluß einmaliger Gaben von Alkohol, Äther, Veronal, Pernocton, Morphin, Kokain, Psicain, Atropin, Polamidon und Nikotin auf die Elektrokrampfschwellen von Ratten. Desgleichen untersuchten wir die Wirkung chronischer Gaben von Veronal und Pernocton.

2. Mittels des Elektroschockverfahrens gelingt es *nicht*, im *akuten* Wirkungsablauf der genannten Stoffe eine erregende Komponente nachzuweisen, die zu einer Krampfschwellensenkung führt. Es steht vielmehr die lähmende Komponente im Vordergrund, so daß es fast immer zu einer deutlichen Krampfschwellenerhöhung kommt.

3. *Chronische* Gaben von Veronal und Pernocton führen zu einer eindeutigen Krampfschwellensenkung, die bei Veronal stärker ist als bei Pernocton.

4. In einer Diskussion wird festgestellt, daß Erregungszustände tieferer Zentren des Zentralnervensystems mit dem Elektroschockverfahren nicht erfaßt werden können, besonders dann nicht, wenn eine gleichzeitige lähmende Wirkung auf die Hirnrinde besteht. Da die untersuchten Stoffe verschiedentlich zu sichtbaren Exzitationserscheinungen führen, ohne dabei eine Senkung der Elektrokrampfschwelle zu bewirken, muß angenommen werden, daß es sich dabei um Erregungen tieferer Zentren handelt.

Literatur.

[1] Schmiedeberg: Grundriß der Pharmakologie. 6. Aufl., S. 52 (1909). — [2] Silver: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **158**, 219 (1930). — [3] Schoen, R.: Münch. med. Wschr. **1936**, 12, 51. — [4] Polisch u. Panse: „Schlafmittelmiß-

brauch." Leipzig: Thieme 1934. — [5] Beckmann: Inaug.-Diss. d. Univ. Münster 1939. — [6] Gerlich: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 159 (1949). — [7] Wolf: Inaug.-Diss. d. Univ. Göttingen 1951. — [8] Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **132**, 214 (1928). — [9] Haas u. Zipf: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 683 (1949). — [10] Gerlich: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 311 (1950). — [11] Lendle u. Ruppert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 478 (1942). — [12] Gley, P.: zit. n. Chauchard, B. u. P. C. r. Soc. Biol. Paris **138**, 318 (1944). — [13] Schoen, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **113**, 257 (1926). — [14] Winniwarter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **185**, 95 (1937). — [15] Stähli: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 11.

Dr. Josef Wolf, Göttingen, Geiststr. 9. Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 29—37 (1951).

Aus dem Institut für Psychologie, Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. H. Düker).

Gruppenversuch zur Bestimmung der kritischen Verschmelzungsfrequenz beim binokularen Sehen: Änderungen unter Koffein und nach normaler Tagesarbeit.

Von
Hans Mücher und Hans-Werner Wendt.

Mit 1 Textabbildung.

(*Eingegangen am 2. Mai 1951.*)

Die Versuche, über die wir in der vorliegenden Arbeit berichten, stehen in engem Zusammenhang mit arbeitspsychologischer und pharmakopsychologischer Forschung. Vor allem interessiert uns die Frage, ob die von uns ausgearbeitete Gruppenmethode zur Bestimmung der visuellen kritischen Verschmelzungsfrequenz (Vfr.) geeignet ist, bei psychologischen Untersuchungen als sinnesphysiologischer Zusatztest verwandt zu werden. Unsere Absicht ist daher nicht, Hypothesen über physiologische Gesetzmäßigkeiten — welcher Art auch immer — zu bilden, sondern wir suchen lediglich Zuordnungen zwischen Änderungen der kritischen Vfr. und solchen Variablen, deren Kontrolle zur Sicherung oder Ergänzung psychologischer Leistungsmessungen zweckmäßig erscheint. Um zu prüfen, ob mit der geplanten Gruppenmethode praktisch verwertbare Bestimmungen durchgeführt werden können, haben wir drei Fragestellungen ausgewählt, deren experimentelle Variablen (nach bereits bekannten, zum Teil allerdings widersprechenden Ergebnissen) einen Einfluß auf die visuelle Vfr. erwarten lassen: Vfr.-Änderungen 1. unter Koffein, 2. nach normaler Tagesarbeit, sowie 3. die Beziehung zwischen Vfr.-Änderungen und subjektiven Urteilen über den Grad geistiger Frische oder Müdigkeit.

I. Versuchsmethode.

Zur Erzeugung des intermittierenden Lichtes benutzen wir einen elektronischen Impulsgenerator, der in einer Glimmlampe in regelmäßiger Folge Entladungen hervorruft. Das Impulsgerät ist so konstruiert, daß die Frequenz automatisch — und im experimentellen Bereich nahezu linear zeitabhängig — variiert werden kann, ohne daß das zeitliche Verhältnis von Licht und Pause sich ändert. Zur Registrierung der individuellen Vfr. betätigt jeder Beobachter einen Reaktionsknopf, sobald für

ihn die kritische Frequenz erreicht ist. Reaktionen und Glimmimpulse werden gemeinsam auf einem Filmstreifen aufgezeichnet.

[Für die Frequenzänderung ist eine Geschwindigkeit zu wählen, bei der unterschiedliche Reaktionszeiten — im normalen Streuungsbereich — die Ergebnisse nur unbedeutend beeinflussen und bloßes Schätzen der Zeit bis zum Eintritt der Verschmelzung nutzlos erscheint. Prinzipielle Vor- und Nachteile von Versuchen, in denen der Reiz ohne Zutun des Beobachters variiert wird, sind bei theoretischen Erörterungen experimentalpsychologischer Methoden mehrfach behandelt worden (vgl. [1], S. 147f. und [2], S. 63f.), so daß wir auf ihre Diskussion verzichten können.]

Die Gründe, die uns zur Wahl dieses Verfahrens bewogen, sind im wesentlichen fogende:

1. Die beschriebene Kombination von automatisch variierbarer Reizerzeugung und gemeinsamer Reiz- und Reaktionsregistrierung erlaubt die gruppenweise Bestimmung individueller Vfr. und erfordert deshalb in Verbindung mit psychologischen Gruppenversuchen nur geringen zusätzlichen Zeitaufwand. So kann kurzfristig umfassendes Zahlenmaterial gewonnen werden, das zur Sicherung der statistischen Signifikanz meist notwendig ist. Außerdem werden einige im Einzelversuch unter Umständen störende Variablen — z. B. mögliche Einflüsse von Witterung und Temperatur, Ablenkung durch gelegentliches Geräusch usw. — für jede Versuchsgruppe konstant gehalten.

2. Nach unseren Vorversuchen ist die Art der Frequenzvariation — Beobachtungszeit bis zum Erreichen der Verschmelzung, Art und Geschwindigkeit der Frequenzänderung u. a. — nicht ohne Einfluß auf die Ergebnisse. Um diese Fehlerquelle zu eliminieren, muß eine gleichmäßige und im Wiederholungsversuch genau reproduzierbare Reizvariation gesichert sein (vgl. auch [3]); Bedingungen, die das von uns verwendete Impulsgerät zufriedenstellend erfüllt.

3. Die Reiz- und Reaktionsregistrierung auf ein und demselben Filmstreifen ermöglicht nachträgliche Auswertung mit ausreichender Genauigkeit, die bei schnellerem Filmtransport innerhalb weiter Grenzen gesteigert werden kann.

Die einfachen mechanischen Anordnungen — etwa durch Elektromotor betriebene Schlitz- oder Lochscheiben, endlose Filme usw.; die kritische Vfr. soll dabei mit Hilfe eines Tourenzählers ermittelt werden — haben durchweg schwer kontrollierbare Fehlerquellen (und ermöglichen auch unter Umständen dem Beobachter, Änderungen des Motorengeräusches oder der mechanischen Vibration in seinem Urteil mit zu verarbeiten). Da im übrigen die automatisch variierbare Reizerzeugung und -registrierung mit exakteren mechanischen Anordnungen unseres Erachtens eines zu großen technischen Aufwandes bedarf, haben wir ein elektronisches Impulsgerät — eine geeignet modifizierte Multivibratorschaltung — gewählt*.

[Von den bereits erfolgreich zu Vfr.-Bestimmungen verwendeten Impulsgeneratoren — Henry arbeitete mit einem RC-Generator (1942, siehe [4]), Halstead vermutlich mit einem Thyratron-Kippgerät (1947, siehe [5], S. 78f.) — haben wir erst während unserer Versuche Kenntnis erhalten. Soweit uns bekannt, sind mit diesen Apparaturen jedoch nur Bestimmungen im Einzelversuch, ohne automatische Frequenzvariation vorgenommen worden.]

* Anregungen über Verwendungsmöglichkeiten elektronischer Schaltungen verdanken wir Herrn Dr. R. Theile, Physikalisches Institut, Marburg (siehe [16]).

II. Technische Beschreibung der Versuchsanordnung.

Der zur Impulserzeugung benutzte Multivibrator besteht im Prinzip aus zwei Systemen von Elektronenröhren, die derart symmetrisch geschaltet sind, daß in periodischem Wechsel jeweils das eine Strom führt und dadurch das andere zeitweise sperrt.

Vereinfachte Darstellung der Arbeitsweise: System I (siehe Abb. 1) führe zunächst Anodenstrom, während System II gesperrt sei. Die negative Vorspannung an dem Gitter des Systems II (G_2) nehme nun fortlaufend ab, so daß in System II ein Anodenstrom (Ia_2) zu fließen beginnt. Der infolgedessen an Ra_2 entstehende Spannungsabfall bewirkt, daß über Cg_1 die Gittervorspannung des ersten Systems

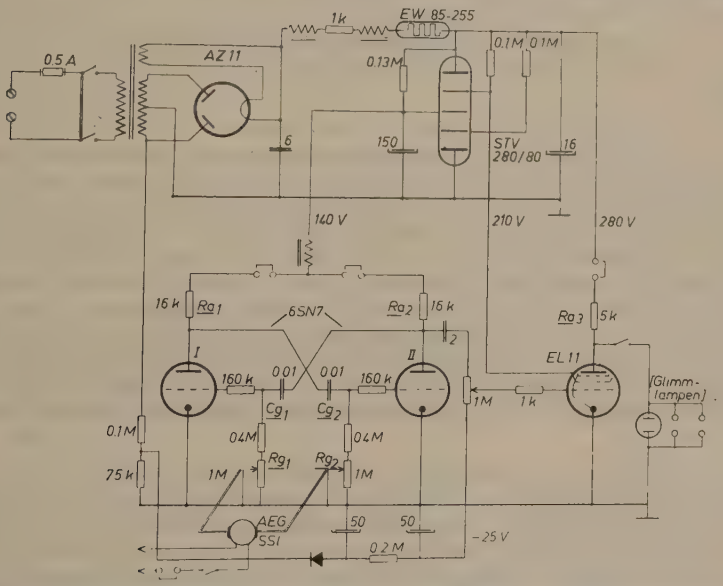


Abb. 1. Schaltung des Impulsgerätes. Nachträgliche Schaltungsänderung: Endröhre EF 14, Glimmlampen in Serie mit Ra_3, Ug_1 (EF 14) durch Glimmstrecke stabilisiert.

zunehmend negativ wird und dementsprechend Ia_1 sinkt. Hierdurch verringert sich in analoger Weise die negative Spannung an G_2 noch mehr, was den Anstieg von Ia_2 (und somit wieder die Verminderung von Ia_1) beschleunigt. Schließlich ist System I völlig gesperrt und II führt maximalen Strom. Dieser Zustand bleibt einige Zeit konstant, da sich die Potentialdifferenz zwischen Gitter und Kathode in System I über Rg_1 nur langsam ausgleicht. Sobald die Spannung an G_1 erneut hinreichend wenig negativ ist, um einen Anodenstrom fließen zu lassen, beginnt dieser den Strom in System II zu verringern. Das wieder beschleunigt die Abnahme der negativen Gitterspannung in System I, bis Maximalstrom fließt, während System II gesperrt ist, usw. Die Frequenz dieses periodischen Kippvorganges — ebenso wie das zeitliche Verhältnis von Sperrung und Stromfluß — ist im wesentlichen eine Funktion der Größen Rg, Cg und Ra. Dabei verlaufen die Spannungsänderungen an den Anoden bei geeigneter Dimensionierung praktisch rechteckig.

Die Impulse, die an der zweiten Anode auftreten, steuern eine Endröhre. Bei Sperrung dieses Systems liegt die Beobachtungsglimmlampe (sowie die parallel

geschalteten Registrier- und Kontrollampen) über Ra_3 an voller Betriebsspannung. Führt dagegen die Endröhre Strom, so wird — durch den Abfall an Ra_3 — die Löschspannung sicher unterschritten.

Die Schaltung des Originalgeräts* entspricht dem Schema der Abb. 1. Um eine gleichmäßige und genau reproduzierbare Frequenzvariation zu sichern, ist das Tandempotentiometer Rg_1-Rg_2 über ein Untersetzungsgetriebe mit einem Synchronmotor (für Zeitlaufwerke) gekoppelt. In unserem Gerät überstreicht das Potentiometer seinen Nutzbereich in 67,5 sec — konstante Netzfrequenz von 50 Hz vorausgesetzt — und variiert damit die Impulsfrequenz von 18,5—65 Hz (sämtliche Vfr.-Werte der bisherigen Versuche liegen zwischen 25,8 und 46 Hz). Die Frequenzkonstanz des Generators ist zufriedenstellend, z. B. ist nach zahlreichen Prüfungen mit einem Zungenfrequenzmesser der 50 Hz-Wert mit einem mittleren Fehler von weniger als 0,5% reproduzierbar. Als Beobachtungslichtquelle dient eine 2,5 W Bienenkorbglimmlampe in einer Milchglaskugel von 12,5 cm Durchmesser.

Für die Registrierung verwenden wir einen abgeänderten Foto-Kymographen vom Typ Hellige M 38. Zur Reaktionsaufzeichnung sind 12 Zwergglühlampen (hinter einer Blechmaske mit 1 mm-Bohrungen) und zur Markierung der Glimmimpulse eine Zwergglimmlampe (hinter einem 0,15 mm breitem Schlitz) unmittelbar vor der Filmebene angebracht. 12 weitere, parallel geschaltete Glühlampen ermöglichen den Versuchsleitern die Kontrolle der Reaktionen, u. a. um unnötigen Filmablauf zu vermeiden. Für die Registrierung in 12 Reaktionskanälen (und für die Glimmarkierung) reicht 6 cm Filmbreite aus, für 24 Reaktionskanäle kann ggf. 12 cm breiter Film verwandt werden (Agfa-Bromsilberregistrierpapier Nr. K 97763 hat sich als ausreichend empfindlich für das Neon-Glimmspektrum erwiesen). Der Film wird mit einer Geschwindigkeit von 40 mm/sec transportiert. Ist größere Ablesegenauigkeit erforderlich, so kann die Geschwindigkeit auf 100 und 200 mm/sec erhöht werden.

[Schwankungen der Netzfrequenz, Schlupf an den Transportwalzen u. a. können Unregelmäßigkeiten in der Aufzeichnung hervorrufen. Da der Hellige-Kymograph — allerdings in Abhängigkeit von der Netzfrequenz — Zeitordinaten von 0,01 und 0,05 sec schreibt, haben wir den Variationskoeffizienten — d. i. die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung in Proz. des Mittelwertes — der 0,01-sec-Zeitschreibung relativ zu einem festen Maßstab ermittelt. Bei 40 mm/sec beträgt der Variationskoeffizient (auf Grund von 320 Messungen) für 2 mm-Intervalle — 6; 10 mm — 0,8; 40 mm — 0,5 und für 80 mm — 0,35. Eine Auszählung von 80 mm-Intervallen gewährleistet also ausreichende Genauigkeit.]

III. Durchführung des Versuches.

Die Beobachter sitzen in einem Kreis von etwa 2,7 m Radius um die kugelförmige Lichtquelle, jeder durch einen Schirm von seinem Nachbarn getrennt. Der Sehwinkel ist hierbei so klein, daß Änderungen der Pupillengröße (etwa durch Koffein) bei Fixation der Lichtquelle unkritisch sind (vgl. [6]), weshalb wir von der Verwendung künstlicher Pupillen oder ähnlichem abgesehen haben (vgl. auch [7]). Sämtliche Bestimmungen

* Die elektrische Ausrüstung des Geräts ist von der Fa. Müller und Engelter, Marburg, hergestellt worden.

werden in aufsteigendem Verfahren — d. h. beginnend mit niedrigen Frequenzen — durchgeführt.

Die Beobachter sind angewiesen:

1. zunächst die flimmernde Lichtquelle ohne Anspannung und ohne Fixation zu betrachten,

2. sobald die Verschmelzung nahe scheint, einen Reaktionsknopf zu drücken und nunmehr scharf zu fixieren — dabei Augenbewegungen zu vermeiden — und

3. den Reaktionsknopf loszulassen, sobald die Verschmelzung eingetreten ist.

In einem Vorversuch wird die Bestimmung der kritischen Vfr. geübt und jedem Beobachter ausreichend Gelegenheit geboten, ein festes, individuelles Verschmelzungskriterium zu bilden, das während der ganzen Versuchsreihe beibehalten werden soll.

An 4 Hauptversuchstagen (in Abständen von 2 und 3 Tagen) wird um 9 und um 17 Uhr jeweils ein Versuch durchgeführt, an dem 12 Beobachter teilnehmen (3 Küchenmädchen, 1 Sekretärin, 2 Studentinnen, 2 Mechaniker, 1 Hochschullehrer und 3 Studenten, sämtlich im Alter zwischen 18 und 35 Jahren). An den Hauptversuchstagen erhält jeder Beobachter eine Koffeintablette (0,1 g, Präparate der Fa. Knoll AG.) oder eine gleich aussehende und gleich schmeckende Leertablette, die er 1 Std vor Beginn des Abendversuchs nehmen soll. Die eine Hälfte der Beobachter erhält das Koffein am 1. und 4., die andere am 2. und 3. Versuchstag.

Die Beobachter werden ausdrücklich gebeten, am Versuchstag und am vorhergehenden Tag keinen Kaffee oder Tee zu trinken, nicht zu rauchen und einen möglichst gleichmäßigen Tagesablauf — Arbeitszeit, Schlaf, Essen usw. — einzuhalten. Die individuelle Tageseinteilung, sowie alle seelischen und körperlichen Besonderheiten suchen wir durch Fragebogen zu ermitteln. Weiter wird u. a. die subjektive Einschätzung der geistigen Frische bzw. Müdigkeit erfragt (die in 5 Stufen angegeben werden soll).

Jeder Versuch umfaßt 15 unmittelbar aufeinanderfolgende Bestimmungen, von denen — ohne Wissen der Beobachter — nur die letzten 7 registriert werden. Die ersten Bestimmungen dienen der Eingewöhnung und der Adaptation an eine schwache Grundbeleuchtung des Versuchsraums (die durch Kontrolle der Spannung konstant gehalten wird). Am Beginn einer jeden Bestimmung sagt einer der Versuchsleiter die laufende Nummer laut an, so daß jeder Beobachter solche Reaktionen, die er für „unzeitig" hält, nachträglich im Fragebogen bezeichnen kann.

IV. Ergebnisse und Diskussion.

Von den sieben registrierten Reaktionen eines jeden Beobachters sind jeweils sechs ausgewertet worden (die siebente ist bei falschen Reaktionen substituiert), so daß insgesamt 576 Vfr.-Werte vorliegen.

Um die Auswertung der Registrierstreifen zu vereinfachen, wird das Erreichen einer bestimmten Frequenz durch Signal bei entsprechender Potentiometerstellung auf dem Film markiert. Das Zeitintervall vom Erreichen dieser Frequenz bis zur Verschmelzungsreaktion (als Funktion der Entfernung auf dem Registrierstreifen) ergibt mit Hilfe einer Eichkurve (welche die Frequenzänderung als Funktion der Zeit angibt) die zugehörige kritische Vfr. Verglichen mit dem Auszählen der einzelnen Vfr. spart dieses Verfahren viel Zeit, ohne die Genauigkeit merklich zu beeinträchtigen. Bei 100 Vergleichswerten beträgt die mittlere Differenz in Proz. der ausgezählten Werte −0,35), die Streuung der proz. Differenzen — das ist die Wurzel ihrer mittleren quadratischen Abweichung — beträgt 1,31.

1. Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Koffein- und Leertage:

Die Morgen- und Abendwerte eines jeden Beobachters werden entsprechend der laufenden Nummer der Vfr.-Bestimmung einander zugeordnet. Ein Vergleich der Abendwerte in % des zugehörigen Morgenwertes ergibt:

Mittl. Proportion an d. Koffeintagen = 100,27,
an d. Leertagen = 94,73, $t_{Diff} = 7{,}06$.

Die statistische Erheblichkeit der Mittelwertdifferenz wird folgendermaßen geprüft: Falls die experimentelle Variable unwirksam ist, sind die Meßergebnisse als Stichproben aus ein und demselben übergeordneten Wertekollektiv anzusehen und die Mittelwertdifferenzen bilden (bei unbegrenzt fortgesetzter Wiederholung der Stichprobenoperation) eine Normalverteilung symmetrisch zum Nullpunkt. Die Wahrscheinlichkeit, bei Unwirksamkeit der experimentellen Variablen einen gleichen oder größeren Betrag der entsprechenden Mittelwertdifferenz zu messen, ist deshalb eine Funktion der t_{Diff}-Werte; dabei ist t_{Diff} die auf Grund einer Stichprobe gemessene Mittelwertdifferenz, angegeben in Einheiten der (geschätzten) Streuung der Mittelwertdifferenzen (vgl. [8]).

Hat das Koffein keinen Einfluß auf die Meßergebnisse, so ist die Wahrscheinlichkeit, eine gleiche (oder größere) Mittelwertdifferenz zwischen Koffein- und Leerproportionen zu erhalten, kleiner als 10^{-10}; der Unterschied ist also in hohem Maße statistisch gesichert.

2. Vergleich der Variationskoeffizienten im Koffein- und Leerversuch:

Die individuelle Streuung in jedem Abendversuch ist angegeben in % des arithmetischen Mittels dieser Abendwerte:

Mittl. Variationskoeff. im Koffeinversuch = 3,21,
im Leerversuch = 2,65, $t_{Diff} = 1{,}46$.

Das Mittel der Variationskoeffizienten unter Koffein ist höher. Die Wahrscheinlichkeit, bei fehlendem Einfluß der experimentellen Variablen eine gleiche (oder größere) Mittelwertdifferenz zwischen Koffein- und Leervariationskoeffizienten zu messen, beträgt etwa 0,07; der Unterschied genügt also nicht ganz dem konventionellen Erheblichkeitskriterium (5%-Grenze).

3. Unterschied zwischen Morgen- und Abendwerten an den Leertagen:

Mittlere Vfr. am Morgen = 35,77 Hz,
am Abend = 33,84 Hz, $t_{Diff} = 0{,}87$.

Im Durchschnitt ist zwar die Vfr. am Abend gesenkt, die Wahrscheinlichkeit, bei Unwirksamkeit der experimentellen Variablen eine gleiche (oder größere) mittlere Differenz zwischen Morgen- und Abendwerten zu erhalten, ist jedoch ungefähr = 0,2; d. h. statistische Signifikanz ist nicht gegeben.

4. Beziehung zwischen subjektiver Einschätzung des Grades geistiger Frische und den Vfr.-Werten im Morgenversuch:

Den 5 Stufen der Frische oder Müdigkeit sind die Zahlen 1, 2, . . ., 5 zugeordnet. Ein Vergleich mit den individuellen Tagesmittelwerten, die im Streuungsmaß sämtlicher derartiger Mittelwerte ein- und derselben Person angegeben sind, läßt keinerlei gesetzmäßige Zuordnung erkennen (der Korrelationskoeffizient ist −0,04).

Über die von uns bearbeiteten Fragestellungen liegen bereits experimentelle Befunde vor, von denen wir nur einige neuere erwähnen:

E. Simonson und N. Enzer fanden bei 19 Labor- und Büroangestellten eine beträchtliche Abnahme der kritischen Vfr. am Ende des Arbeitstages, sowie eine positive Korrelation zwischen dem Absinken der Vfr. und dem subjektiven Ermüdungsgrad[9]. — A. Graybiel und Mitarbeiter konnten bei 32 Militärfluglehrern zwischen Vfr.-Änderungen und subjektiver Müdigkeit keine Korrelation finden[10]. — R. H. Lee untersuchte 528 Überlandfahrer und stellte eine geringe Abnahme der kritischen Vfr. in Abhängigkeit von der Fahrzeit fest[11]. — J. Brozek und A. Keys berichten, daß erst tagelange schwerste körperliche Arbeit unter Hungerbedingungen die kritische Vfr. erheblich zu senken vermag[12]. — Nach Ergebnissen von H. Schmidtke sinkt bei Schulkindern die kritische Vfr. im Laufe des Unterrichts. H. Schmidtke stellte ferner eine Erhöhung der Vfr. unter Koffein fest[13]. Nach Untersuchungen von N. T. Fedorov und L. Mkrticheva wird die Vfr. durch Koffein nicht beeinflußt[14].

Die Untersuchungsergebnisse H. Schmidtkes, nach denen unter Koffein die Vfr. steigt, werden durch unsere Befunde eindeutig bestätigt. Abweichende Resultate — wie sie N. T. Fedorov und L. Mkrticheva erzielten — sind eventuell auf unterschiedliche Versuchsmethodik zurückzuführen, vgl. [15]. (Unter Umständen ist es auch kritisch, ob das Koffein ermüdeten oder frischen Vp gegeben wird o. ä.).

Das Absinken der kritischen Vfr. im Laufe eines Arbeitstages kann möglicherweise durch zusätzliche Untersuchungen gesichert werden. Die bisherigen Ergebnisse legen aber nahe, daß die Art der Tagesarbeit von Bedeutung ist: körperliche Arbeit scheint — unter normalen Umständen — die Vfr. wenig zu beeinflussen; Untersuchungen bei wesentlich visuellen Tätigkeiten — Labor- und Büroarbeit, Schulunterricht, Überlandfahren — dagegen führt zur Herabsetzung der Vfr.

Die Ergebnisse von E. Simonson und N. Enzer, die eine positive Korrelation zwischen subjektiver Ermüdung und Absinken der Vfr. ergaben, können durch unsere Resultate nicht bestätigt werden. Da in unserer Untersuchung die Zahl der Wertepaare relativ gering ist ($n = 48$), bleibt praktisch die Möglichkeit offen, bei zusätzlichen Untersuchungen eine positive Korrelation zu finden.

Über die Vorzüge und Nachteile des Gruppenversuchs gegenüber der Einzeluntersuchung kann erst nach systematischem Vergleich (vor allem der Streuung) endgültig entschieden werden. Zwar ist die Gruppenuntersuchung prinzipiell genau so durchführbar wie eine Einzelbestimmung mit automatischer Reizvariation; möglicherweise aber lassen sich praktisch einige „gruppenpsychologische Variablen" (gegenseitige Beeinflussung, evtl. auch nur das Bewußtsein, die Bestimmung gleichzeitig mit anderen Personen vorzunehmen oder ähnliches) nicht hinreichend ausschalten. Immerhin kann auf Grund der ersten Versuchsergebnisse (vor allem wegen des eindeutigen Nachweises der Koffeinwirkung) festgestellt werden, daß mit der Gruppenmethode, die ohne Zweifel — auch hinsichtlich der technischen Lösung* — noch verbesserungsfähig ist, praktisch verwertbare Resultate erzielt werden können**.

Zusammenfassung.

Eine Gruppenmethode zur Bestimmung der binokularen kritischen V.fr. sollte daraufhin geprüft werden, ob sie als Zusatztest bei psychologischen Leistungsmessungen geeignet ist.

Automatisch variierbare Reizerzeugung (durch elektronischen Impulsgenerator und Glimmlicht) kombiniert mit gemeinsamer Registrierung der Generatorimpulse und der Reaktionen der Beobachter ermöglicht den Gruppenversuch, der in dieser Form methodische und technische Vorteile zu gewähren scheint.

576 Morgen- und Abendbestimmungen, an denen 6 vorwiegend körperlich und 6 vorwiegend geistig tätige männliche und weibliche Beobachter teilnehmen, führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Gaben von 0,1 g Koffein, 1 Std vor dem Abendversuch genommen, wirken mit großer statistischer Signifikanz steigernd auf die Vfr.

2. Die individuellen Variationskoeffizienten sind in den Koffeinversuchen höher, das konventionelle Erheblichkeitskriterium (die 5%-Grenze) ist jedoch nicht ganz erreicht.

3. Die Abendwerte liegen statistisch unbedeutend unter den Werten am Morgen eines Arbeitstages.

4. Zwischen Vfr.-Änderungen und subjektiven Müdigkeitsgraden wird keine Korrelation gefunden.

---

* Gegenwärtig wird eine Modifikation der Methode vorbereitet, durch die Gruppenversuche auch ohne Filmregistrierung ermöglicht werden.

** Die Untersuchung ist gemeinsam geplant und durchgeführt, dabei hat vor allem H.-W. Wendt die Probleme der automatisch variierbaren Impulserzeugung bearbeitet.

Die Ergebnisse — vor allem der Nachweis der Koffeinwirkung — bestätigen, daß die Gruppenmethode hinreichend genaue Bestimmungen erlaubt, um in Verbindung mit arbeitspsychologischen und pharmakopsychologischen Versuchen als Zusatztest verwandt zu werden.

Literatur.

[1] Titchener, E. B.: Experimental Psychology, vol. II, part II. New York 1923. — [2] Guilford, J. P.: Psychometric Methods. New York 1936. — [3] Simonson, E., N. Enzer u. S. S. Blankstein: J. exp. Psychol. **29**, 252 (1941); Psychol. Abstracts **1941**, Nr. 4974. — [4] Henry, F.: J. exp. Psychol. **31**, 538 (1942); Psychol. Abstracts **1943**, Nr. 748. — [5] Halstead, W. C.: Brain and Intelligence. Chicago 1947. — [6] Speiser, S.: Ophtalmologica **116**, 357 (1948); Psychol. Abstracts **1949**, Nr. 2559. — [7] Knox, G. W.: J. gen. Psychol. **33**, 121 (1945); Psychol. Abstracts **1946**, Nr. 65. — [8] Koller, S.: Allgemeine statistische Methoden ... In: Handbuch der Erbbiologie des Menschen, Bd. II, S. 112f. Berlin 1940. — [9] Simonson, E., u. N. Enzer: J. industr. Hyg. **23**, 83 (1941); Psychol. Abstracts **1941**, Nr. 5088. — [10] Graybiel, A., J. L. Lilienthal jr. u. O. Horwitz: J. Aviat. Med. **14**, 356 (1943); Psychol. Abstracts **1944**, Nr. 1319. — [11] Lee, R. H.: Publ. Health Bull. **1941**, Nr. 265, 195; Psychol. Abstracts **1941**, Nr. 4774). — [12] Brozek, J., u. A. Keys: J. industr. Hyg. **26**, 169 (1944); Psychol. Abstracts **1945**, Nr. 1141. — [13] Schmidtke, H.: Flimmertest und psychische Ermüdung. Diss. Braunschweig 1949 (nicht zugänglich). — [14] Fedorov, N. T., u. L. Mkrticheva: Nature (Lond.) **142**, 750 (1938); Psychol. Abstracts **1941**, Nr. 4543. — [15] McQuarrie, C. W., u. E. M. Ingram: Optom. Wkly (1950), **41**, 1617; Psychol. Abstracts **1951**, Nr. 2833. — [16] Theile, R.: Funk **1940**, H. 22, 337.

Hans Mücher, Hans-Werner-Wendt,
Institut für Psychologie, Universität Marburg a. d. Lahn.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 38—54 (1951).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Adsorption und Haftfestigkeit pharmakologisch aktiver Alkaloid-Kationen an der Kollodium-Membran.

Physikalisch-chemische Grundversuche zur „competitive Inhibition".

Von
A. Fleckenstein, H. Günther und H. J. Winker.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Mai 1951.)

Zahlreiche pharmakologisch interessierende Antagonismen beruhen vermutlich auf dem Prinzip der „competitive Inhibition", d. h. auf der Verdrängung eines spezifischen Wirkstoffs von seinen Rezeptoren durch einen in mancher Beziehung ähnlichen Körper, der aber nicht mehr die spezifische Wirkung des verdrängten Stoffs besitzt. Eine solche Verdrängungsreaktion wird um so leichter erfolgen, je größer die Affinität der konkurrierenden Substanz zu dem gemeinsamen Rezeptor ist.

Diese heute sehr geläufigen Vorstellungen entbehren aber noch in mancher Beziehung einer physikalisch-chemischen Fundierung. Insbesondere ist unbekannt, inwieweit für die Stärke dieser Affinitäten schon bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften und Besonderheiten der einzelnen Stoffe (Adsorbierbarkeit, Lipoidlöslichkeit usw.) ausschlaggebend sein können. Die im folgenden wiedergegebenen Untersuchungen erstreckten sich hauptsächlich auf die Prüfung der adsorptiven Bindung und der Haftfestigkeit von stickstoffhaltigen organischen Kationen (Alkaloid-Kationen im weitesten Sinne) an der Kollodium-Membran. Solche Versuche erschienen uns wichtig,

a) weil die meisten pharmakologisch interessierenden Antagonismen (Azetylcholin-Atropin, Azetylcholin-Lokalanästhetika, Atropin-Pilokarpin, Histamin-Antihistaminika, Adrenalin-Sympatholytika usw.). Antagonismen zwischen derartigen Alkaloid-Kationen sind,

b) weil die Kollodium-Membran in Anbetracht ihrer elektro-negativen Ladung mit den Membran-Kolloiden der Muskel-, Nerven- und Drüsenzellen vergleichbar ist, an welchen diese Alkaloid-Kationen vermutlich adsorptiv gebunden werden bzw. sich gegenseitig verdrängen,

c) weil die Theorie der „competitive Inhibition" im Falle dieser Alkaloide bisher nur durch Untersuchungen am lebenden Objekt gestützt

wird, aber bislang kaum Angaben über die natürlichen Affinitäten zu unbelebten, negativ geladenen Membran-Oberflächen vorliegen.

Von besonderer Bedeutung ist, daß die Kollodium-Membran als Alkaloid-Adsorbens auch methodisch außerordentliche Vorteile bietet; denn die Bindung der Alkaloid-Kationen kann — wie im folgenden näher beschrieben — an diesem Objekt fortlaufend elektrisch gemessen werden.

Experimenteller Teil.

I. Prinzip und Methodik der Adsorptions-Messung an der Kollodium-Membran.

a) Das Prinzip. Die „Poren", welche eine getrocknete Kollodium-Membran durchsetzen, sind nach den Untersuchungen von Michaelis und Fujita[18] als selektiv permeabel für Kationen anzusehen, während die Anionen am Durchtritt gehindert werden (vgl. auch H. Schaefer[21]).

Diese bevorzugte Kationen-Permeabilität ist ein elektrostatisches Phänomen; denn die Wandungen der Poren sind negativ geladen und stoßen daher Anionen ab. Die wandnahen Anteile des Poren-Lumens stehen daher nur für die Permeation von Kationen zur Verfügung, d. h. die Pore hat für Kationen eine größere Weite als für Anionen. Schrumpft das Poren-Lumen beim Trocknungsprozeß, so nähern sich die Poren-Wandungen unter Umständen soweit, daß das gesamte Poren-Lumen unter den Einfluß der elektronegativen Wand-Ladungen gerät und damit für Anionen völlig undurchgängig wird. Es ist demnach eine Frage des — vom Trocknungsgrad der Membran abhängigen — Poren-Durchmessers, ob die selektive Kationen-Permeabilität der Kollodium-Membran schwach oder stark in Erscheinung tritt. Hinsichtlich der speziellen Theorie der Kollodium-Membran ist auf die außerordentlich eingehenden Arbeiten von K. H. Meyer und Sievers[17] sowie Teorell[23] zu verweisen.

Wird eine getrocknete Kollodium-Membran zwischen zwei verschieden konzentrierte Lösungen desselben Elektrolyten (in unseren Versuchen M/100 KCl $= c_1$ und M/1000 KCl $= c_2$) gebracht, so tritt bekanntlich ein Diffusions-Potential auf, wobei das besser diffundierende K^+ seine positive Ladung der verdünnteren Lösung mitteilt.

Die Höhe dieses Potentials ist nach der Nernstschen Formel zu berechnen:

$$E = \frac{u - v}{u + v} \cdot 0{,}0001983\, T \log \frac{c_1}{c_2} \text{ Volt.}$$

Dabei bedeutet u die relative Beweglichkeit der Kationen, v die relative Beweglichkeit der Anionen in der Membran, T die absolute Temperatur. Das zu messende Potential ist um so höher, je stärker die Differenz der Wanderungsgeschwindigkeiten zwischen Kation und Anion ist, d. h. je mehr die Beweglichkeit der Anionen im Verhältnis zu den Kationen herabgesetzt wird. Wenn die Membran nur noch für Kationen durchgängig ist ($v = 0$), wird das Potential maximal. Der theoretische Höchstwert bei 18° C und einem Konzentrationsverhältnis zwischen c_1 und c_2 von 10 : 1 ist dann etwa 58 mV. Dagegen wäre das Potential gleich Null, wenn sich bei einer Membran die Wanderungsgeschwindigkeiten von Kation und Anion nicht unterscheiden würden ($u = v$).

Die selektive Kationen-Permeabilität der Kollodium-Membran läßt sich nun, wie Mond und Hoffmann[19] zuerst fanden, ins Gegenteil verkehren, wenn durch Einlagerung des basischen Farbstoffs Rhodamin B die sonst negative Wandladung der Pore positiv wird und infolgedessen Kationen abgestoßen werden. Da jetzt Cl^- besser als K^+ diffundiert, wird die verdünnte Lösung negativ, d. h. die Richtung des Membran-Potentials ist nunmehr umgekehrt wie bei einer gewöhnlichen Kollodium-Membran. Die gleiche Wirkung wie Rhodamin B haben auch andere basische Farbstoffe sowie einige Alkaloidsalze (Chinin, Chinidin, Strychnin, Brucin, Kokain; vgl. Wilbrandt[25], Abrams und Sollner[1], Harkewitsch[13]). Diese Stoffe wurden den ätherischen Kollodium-Lösungen in entsprechender Konzentration meist vor der Herstellung der Membranen zugesetzt.

In eigenen Versuchen fanden wir nun, daß Alkaloidsalze auch eine fertige kationen-permeable Kollodium-Membran rasch selektiv anionenpermeabel machen können, wenn sie z. B. in die M/100 KCl-Lösung auf der einen Seite der Membran gegeben werden. Auch bei dieser Versuchsanordnung tritt offenbar eine Anlagerung von Alkaloid-Kationen an die negativen Porenwandungen der Kollodium-Membran ein. *Das Prinzip unserer Adsorptionsbestimmung besteht nun darin, daß durch Messung des Membran-Potentials zwischen einer M/100 und M/1000 KCl-Lösung diese adsorptive Bindung von Alkaloid-Kationen fortlaufend verfolgt wird.* Dabei sind verschiedene Grade der Kationen-Einlagerung zu unterscheiden:

1. Grad = teilweise Absättigung der negativen Wand-Ladung der Poren durch Alkaloid-Kationen. In Abhängigkeit davon geht die selektive Kationen-Permeabilität der Kollodium-Membran zurück und das Potential sinkt.

2. Grad = volle Absättigung der negativen Wand-Ladung der Poren durch Alkaloid-Kationen. Die Membran-Pore wird „isoelektrisch" und für Anionen und Kationen gleich gut durchgängig. Das Membran-Potential ist dann bei gleicher Wanderungsgeschwindigkeit des Kations und Anions (wie z. B. bei Verwendung von KCl) gleich Null.

3. Grad = Positivierung der ursprünglich negativen Wand-Ladung durch Adsorption der Alkaloid-Kationen. In Abhängigkeit davon kehrt sich die Richtung des ursprünglichen Membran-Potentials nach Durchlaufen des Nullpunktes um

Wäscht man die Membran wieder aus, so sind diese Stadien — je nach der Affinität des Alkaloids zu den Porenwandungen — ganz reversibel, teilweise reversibel oder auch nicht reversibel. Die folgenden Meßergebnisse zeigen, daß sich die Alkaloid-Adsorption an einer negativ geladenen Oberfläche mit unserer Methode in ihrem ganzen zeitlichen Ablauf einfach erfassen läßt.

b) Die spezielle Methodik. Herstellung der Membranen: Ein am Boden durchbohrtes Reagensglas (Durchmesser des Loches etwa 1 mm) wird etwa 10 cm tief in eine 4%ige alkoholisch-ätherische Kollodiumlösung (Merck, DAB 6) für einige Sekunden eingetaucht. Danach wird durch leichtes Rotieren eine gleichmäßige

Verteilung der außen am Reagensglas haftenden Kollodiumlösung erzielt und 3—5 min lang bei Zimmertemperatur an Luft getrocknet. Um stabilere Membranen zu erhalten wurde diese Prozedur (kurzes Eintauchen, 3—5 min Trocknen) 10mal wiederholt. Nach Herstellung der 10. Schicht wurde das Reagensglas 20 min lang in Wasser eingelegt. Anschließend wurde die Membran vom Reagensglas abgezogen und mit Warmluft behandelt, bis eine stärkere Schrumpfung — und in Abhängigkeit davon eine selektive Kationen-Permeabilität — eingetreten war.

Messung der Potentialveränderungen bei der Alkaloid-Adsorption: Die Potentialmessung erfolgte nach der Kompensationsmethode unter Verwendung eines Potentiometers. Zur Ableitung dienten unpolarisierbare Zink-Zinksulfat-Pinsel-Elektroden. Im einzelnen wurde folgendes Routineverfahren angewendet:

1. Bestimmung des Ausgangspotentials der Kollodium-Membran während 10 min und Prüfung auf Konstanz des Potentials (0,01 mol KCl-Lösung im Innern der Membranhülse, 0,001 mol KCl-Lösung außen in einem Becherglas). Das Potential beträgt im allgemeinen bei den aus Kollodium (Merck) hergestellten Membranen 30—35 mV. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (vgl. WILBRANDT[25], ABRAMS und SOLLNER[1]) wurde das theoretische Maximum des Potentials (etwa 58 mV bei 18° C) nie erreicht; neben dem Trocknungsgrad ist auch die Art des verwendeten Kollodiums für die Höhe des Potentials entscheidend.

2. Auswechseln der reinen 0,01 mol KCl-Lösung in der Membranhülse gegen die Alkaloid-KCl-Lösung. Sämtliche zu prüfenden Alkaloide lagen als Hydrochloride vor und wurden jeweils in einer Konz. von 0,02 mol/l in 0,01 molarer wäßriger KCl-Lösung zur Einwirkung gebracht.

3. Wiederholte Messungen im Abstand von jeweils 5 min, bis das ursprünglich positive Potential der äußeren Lösung auf einen Endwert absinkt bzw. nach Durchlaufen des Nullpunkts auf etwa Minus 20—25 mV umschlägt.

4. Anschließend Ausgießen der Alkaloid-KCl-Lösung und 3maliges kurzes Ausspülen der Membranhülse mit reichlich Aqua dest.; Füllung der Membranhülse mit alkaloidfreier 0,01 mol KCl-Lösung und 2 min später Potentialmessung. Die alkaloidfreie KCl-Lösung verbleibt anschließend 3 min in der Membranhülse.

5. Nach 5 und 10 min wird die 3malige Spülung mit Aqua dest. und die anschließende Potentialmessung — nach erneuter Einfüllung alkaloidfreier 0,01 mol-KCl-Lösung in die Membranhülse — wiederholt.

6. Durch weitere Messungen im Abstand von 5 min werden die Potential-Veränderungen weiter verfolgt.

Bei den meisten Alkaloid-Hydrochloriden wurden verschiedene Konzentrationen geprüft. Um jedoch eine gemeinsame Vergleichsbasis für alle Substanzen zu haben, sind im folgenden immer nur die Meßergebnisse bei Anwendung der 0,02 mol-Lösung (jeweils 3 Versuche bei dieser Konzentration) näher besprochen. Die Potentialkurven dieser 3 Parallelversuche nehmen immer einen sehr ähnlichen Verlauf.

Das Ausgangs-Potential der Kollodium-Membran ist regelmäßig etwas niedriger, wenn an Stelle der 0,01 mol-KCl-Lösung (innen) und der 0,001 mol-KCl-Lösung (außen) eine 0,1 mol-KCl-Lösung (innen) und 0,01 mol-KCl-Lösung (außen) verwendet wird. Die Potentialeffekte des Alkaloidzusatzes (0,02 mol-Alkaloid-Hydrochlorid in der 0,1 mol-KCl-Lösung) sind aber auch bei diesem — mit 10fach konzentrierterem KCl-Lösung arbeitenden — System im Prinzip nicht anders als gewöhnlich.

II. Die adsorptive Bindung von sympathikomimetischen und sympathikolytischen Stoffen an der Kollodium-Membran.

a) Sympathikomimetika. Sämtliche von uns geprüften adrenergisch wirksamen Substanzen werden von der Kollodium-Membran mit mehr oder weniger großer Geschwindigkeit adsorbiert. Suprarenin, Aludrin, Veritol,

Tabelle 1. *Der Einfluß sympathikomimetischer und sympathikolytischer Stoffe auf das Potential der Kollodium-Membran*.*

Substanz	Ausgangs-Potential mV	Maximale Potentialänderung Endwert mV	Maximale Potentialänderung Nach Min.	Potentiale nach Auswaschung mV 5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
Suprarenin .	+ 34	— 4	60	+ 14	+ 25	+ 30	+ 32	+ 34	+ 34
Aludrin . . .	+ 39	— 25	10	+ 11	+ 16	+ 22	+ 29	+ 38	+ 41
Sympatol . .	+ 40	+ 2	80	+ 22	+ 30	+ 34	+ 35	+ 36	+ 36
Veritol . . .	+ 26	— 5	60	+ 8	+ 10	+ 12	+ 11	+ 12	+ 12
Adrianol . .	+ 34	— 20	30	+ 27	+ 33	+ 35	+ 39	+ 39	+ 39
Ephedrin . .	+ 30	— 18	50	+ 14	+ 15	+ 17	+ 18	+ 18	+ 18
Pervitin . .	+ 26	— 25	6	— 3	+ 3	+ 7	+ 10	+ 11	+ 11
Yohimbin . .	+ 26	— 19	30	— 17	— 14	— 15	— 16	— 16	— 16
Priscol . . .	+ 35	— 23	40	— 10	— 9	— 9	— 9	— 9	— 10
Dibenamin .	+ 41	— 22	170	— 6	— 6	— 6	— 7	— 6	— 8
Präparat 7337	+ 34	— 23	30	— 11	— 11	— 10	— 9	— 9	— 9

* Im Innern der Membranhülse jeweils 0,01 mol-KCl-Lösung (ohne bzw. mit einem 0,02 mol Alkaloidgehalt), außen konstant eine 0,001 mol-KCl-Lösung. Das Vorzeichen des Potentials bezieht sich — ebenso wie in den folgenden Tabellen — jeweils auf die verdünntere Außenlösung.

Adrianol, Ephedrin und Pervitin setzen dabei infolge Einlagerung in die Membranporen die selektive Kationen-Permeabilität der Membran und damit das Potential rasch herab. Relativ langsam verlief nur die Adsorption von Sympatol, das nach 80 min Einwirkung (vgl. Tab. 1) das Ausgangspotential von + 40 mVolt auf + 2 mVolt senkte (2. Grad der Adsorption). Stärker als Sympatol werden die anderen Sympathikomimetika gebunden; dabei kommt es in allen Fällen zu einer Potentialumkehr durch Positivierung der Porenwandung (3. Grad der Adsorption). Das Maximum der Kationen-Impermeabilität wurde bei diesen Stoffen nach 6—60 min annähernd erreicht. Aludrin und Pervitin erzeugen einen besonders raschen Potentialumschlag. Auch bei den anderen Substanzen zeigt die Adsorption jeweils einen charakteristischen, kurvenmäßig wiederzugebenden Verlauf.

Diese adsorptive Anlagerung der Sympathikomimetika an der Kollodium-Membran ist in allen Fällen locker und kann durch einfaches Auswaschen der Membran schnell wieder rückgängig gemacht werden; Suprarenin,

Aludrin, Sympatol und Adrianol lösen sich innerhalb von 20—25 min gänzlich aus der Membran heraus; infolgedessen erreicht das Potential innerhalb dieser Zeit praktisch wieder die Ausgangswerte (vgl. Tab. 1). Regelmäßig kehrt bereits während der ersten Waschung die selektive Kationen-Permeabilität zurück. Dagegen werden Veritol, Ephedrin und Pervitin — trotz rascher und weitgehender Reversibilität der Bindung — innerhalb 30 min noch nicht völlig von der Membran-Oberfläche freigegeben. Diese Substanzen zeigen auch in ihren pharmakologischen Effekten gewisse Ähnlichkeiten.

b) Sympathikolytika. Da Ergotamin zu wenig wasserlöslich ist, mußte sich die Prüfung sympathikolytischer Substanzen auf Yohimbin, Priscol, Dibenamin und Substanz 7337 (Ciba*) beschränken. Auch diese Stoffe werden von der Kollodium-Membran gebunden und kehren — ebenso wie die Sympathikomimetika — die ursprünglich selektive Kationen-Permeabilität in eine selektive Anionen-Permeabilität um. Überraschende Besonderheiten traten erst bei dem Versuch zutage, Yohimbin, Priscol, Dibenamin und Substanz 7337 wieder aus der Kollodium-Membran auszuwaschen: *Während bei sämtlichen sympathikomimetischen Substanzen die Adsorption sofort weitgehend reversibel ist, können die Sympathikolytika von der Kollodium-Membran kaum mehr abgelöst werden*; selbst nach 12 Std Aufenthalt in Aqua dest. waren diese Membranen immer noch vorzugsweise anionen-permeabel. *Die Affinität der Sympathikolytika zu den negativen „Rezeptoren" der Kollodium-Membran ist also außerordentlich viel größer als die Affinität der Sympathikomimetika.*

Daß dies offenbar auch für Ergotamin zutrifft, ließen Versuche erkennen, in denen durch stundenlange Einwirkung einer Ampullenlösung von Ergotamintartrat 1:2000 auf die Kollodium-Membran ein irreversibler Potentialumschlag erzeugt wurde.

III. Die adsorptive Bindung von cholinergischen Stoffen und spezifischen Azetylcholin-Antagonisten an der Kollodium-Membran.

a) Azetylcholin und Verwandte. Cholinergische Substanzen werden von der Kollodium-Membran ebenfalls adsorbiert. Azetylcholin und Mecholyl (Methylazetylcholin) erzeugen dabei durch Umladung der Membran einen raschen Potentialumschlag, während Cholin in gleicher Konzentration das Ausgangspotential meist nur bis auf niedere Werte senkt. *Azetylcholin und Mecholyl haben also erheblich größere Affinitäten zur Kollodium-Membran als Cholin.* Esmodil (Trimethyl-methoxy-propenyl-ammoniumbromid) verhält sich ähnlich wie Cholin. Auch Doryl scheint zur Membran etwas größere Affinitäten als Cholin zu besitzen (vgl. Abb. 1).

Ebenso wie die Sympathikomimetika lassen sich auch die cholinergischen Stoffe durch Waschen wieder gut aus der Membran entfernen. Nach 5 bis

* Hydrochlorid des 2-[N, p-Tolyl-N-(m'-oxy-phenyl)-aminomethyl]-imidazolins.

10 min sind die Effekte von Cholin, Esmodil und Doryl auf das Membranpotential meist wieder völlig verschwunden; Azetylcholin und Mecholyl lösen sich innerhalb von 25—30 min ebenfalls fast vollständig von der Membran-Oberfläche ab.

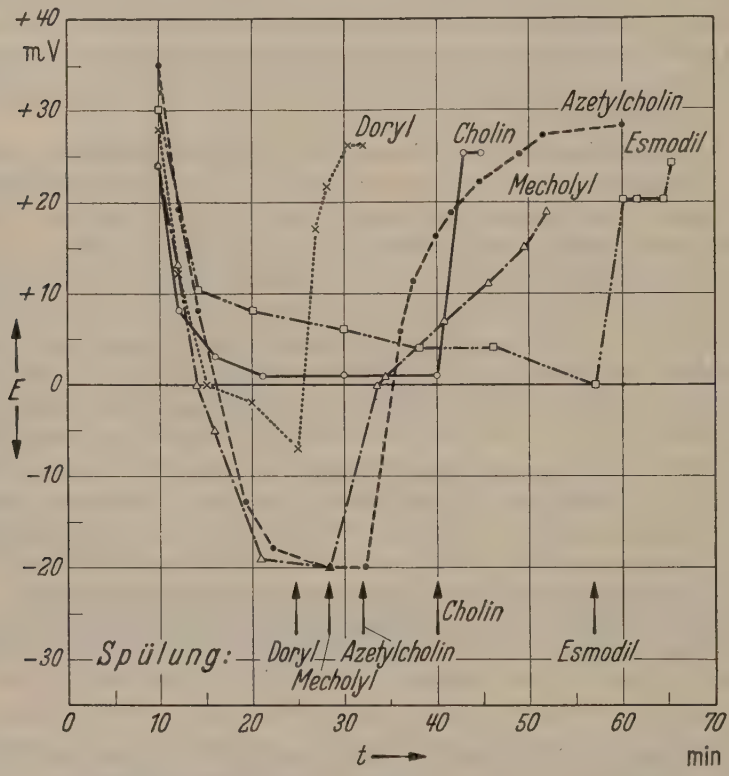


Abb. 1. *Verlauf der Adsorption cholinergischer Substanzen an der Kollodium-Membran.* Cholin und Esmodil werden langsam adsorbiert und senken das Potential bis gegen den Nullpunkt; bei Doryl, Azetylcholin und Mecholyl kommt es zum Potential-Umschlag. Auswaschen stellt das positive Ausgangs-Potential in allen Fällen rasch wieder her. Der Pfeil (→) gibt jeweils den Beginn des Auswaschens an.

Beurteilt nach der Stärke und Geschwindigkeit des Potentialumschlags sowie nach der Reversibilität beim Auswaschen würde die Affinität der cholinergischen Stoffe zur Kollodium-Membran etwa in folgender Reihenfolge abnehmen:

Mecholyl > *Azetylcholin* > *Doryl* > *Esmodil, Cholin.*

Die Affinitäten cholinergischer Stoffe zum lebenden Gewebe (z. B. isoliertes Froschherz, vgl. Clark[3], Jung[15], Moratschek[20], Voigt[24]) zeigen insofern gewisse Ähnlichkeiten, als auch hier Esmodil und Cholin schwächer, Azetylcholin, Mecholyl und Doryl stärker gebunden werden.

b) Azetylcholin-Antagonisten. Auch die Azetylcholin-Antagonisten führen infolge der adsorptiven Bindung zu einem Potentialumschlag; ein

Auswaschen gelingt jedoch überhaupt nicht oder erst im Laufe von vielen Stunden: Parpanit und Trasentin zeigen z. B. praktisch keine Tendenz sich wieder von der Membran zu lösen (vgl. Abb. 2); das Potential war daher bei der Messung nach 12 Std, 20 Std und 24 Std Aufenthalt in Aqua dest. gegenüber dem Potential nach der ersten Spülung immer noch unverändert. Das gleiche Verhalten wie Parpanit und Trasentin zeigen auch die Verwandten von Trasentin* (Comp. 600, 606, 1565,

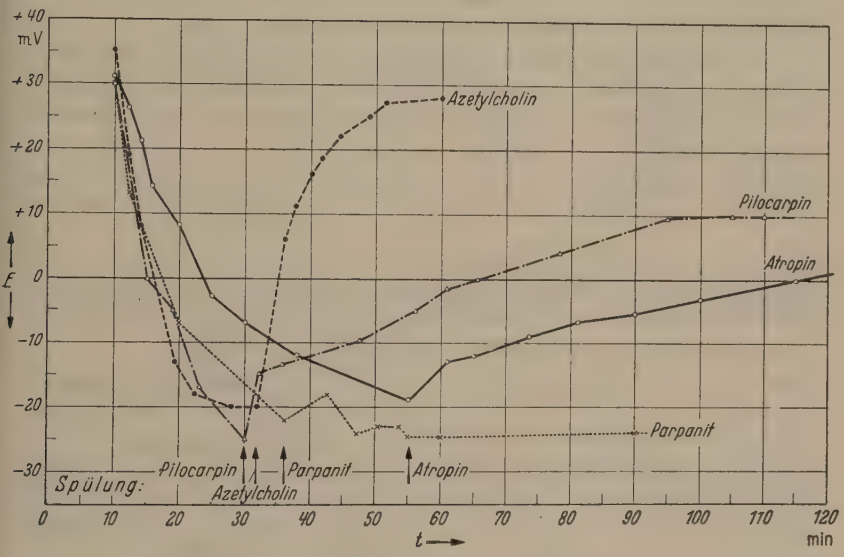


Abb. 2. *Verlauf der Adsorption von Azetylcholin, Pilocarpin, Atropin und Parpanit.* Der Potential-Umschlag nach Anwendung von Pilocarpin und Atropin ist mit annähernd gleicher Geschwindigkeit reversibel; Parpanit lädt die Membran für dauernd um.

1597), deren Anti-Azetylcholin-Effekte erstmals von Lands, Hooper, McCarthy und Feldkamp[16] beschrieben worden sind (vgl. Tab. 2). Eine ähnlich hohe Affinität zur Kollodium-Membran besitzt auch d-Tubocurarin. Dagegen scheint Atropin (und auch Comp. 623) etwas weniger stark zu haften, so daß sich häufig langsam nach einigen Stunden wieder eine überwiegende Kationen-Permeabilität einstellen kann. *Die Azetylcholin-Antagonisten zeigen also nicht nur am lebenden Objekt, sondern auch an der negativen Kollodium-Membran weit stärkere Bindungs-Affinitäten als cholinergische Stoffe.*

Von besonderem Interesse ist, daß Pilokarpin an der Kollodium-Membran nur wenig schwächer als Atropin haftet. Die Potentialkurven für beide Stoffe sind daher — besonders in der Phase des Auswaschens — auffallend ähnlich (vgl. Abb. 2). Ein Unterschied bestand nur darin,

* Zur Konstitution dieser Stoffe vgl. diese Zeitschrift[10].

daß sich Pilokarpin nach vielen Stunden Spülung wieder vollständig aus der Membran entfernen ließ, während bei Atropin keine volle Rückkehr zum Ausgangspotential beobachtet wurde. *Eine wechselseitige Verdrängung von Pilokarpin und Atropin im Organismus erscheint nach*

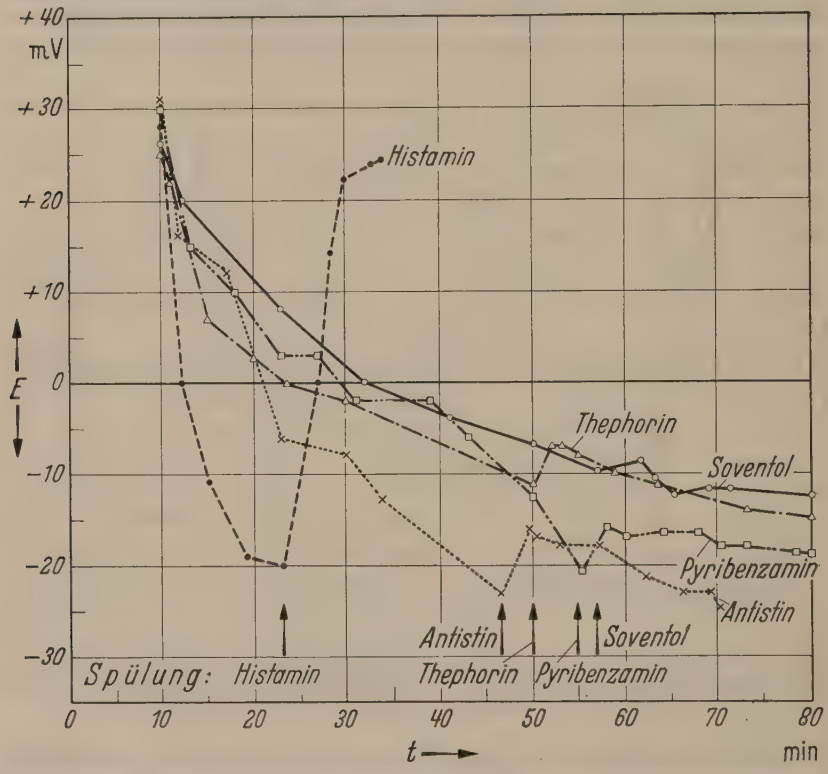


Abb. 3. *Verlauf der Adsorption von Histamin und Antihistaminkörpern.* Histamin läßt sich nach der Adsorption sofort wieder aus der Membran entfernen, während der Potential-Umschlag nach der Bindung von Soventol, Thephorin, Pyribenzamin und Antistin praktisch irreversibel ist.

diesem Ergebnis sehr gut diskutierbar. An der Speicheldrüse des Hundes neutralisiert 0,5 mg Atropin den Effekt von 5 mg Pilokarpin (Cushny[5]).

IV. Die adsorptive Bindung von Histamin, Antihistaminkörpern und gewöhnlichen lokalanästhetischen Stoffen an der Kollodium-Membran.

a) Histamin. Auch Histamin (vgl. Abb. 3) wird rasch in die Poren der Kollodium-Membran eingelagert. Nach 11 min Einwirkung war bei dem in Abb. 3 wiedergegebenen Versuch das Ausgangspotential von + 28 mVolt auf — 20 mVolt umgeschlagen. Diese selektive Anionen-

permeabilität läßt sich jedoch sofort wieder beseitigen; nach 10 bis 15 min wird das Ausgangspotential fast wieder erreicht. Zahlreiche Versuche mit Histamin haben immer wieder zu fast identischen Kurvenverläufen geführt.

b) Antihistaminika. In starkem Gegensatz hierzu steht das Verhalten der Antihistaminika Antistin, Pyribenzamin, Thephorin und Soventol, deren Adsorption nicht mehr rückgängig gemacht werden kann.* Selbst nach 24 Std Aufenthalt in Aqua dest. oder KCl-Lösung waren die Membranen für Kationen noch weitgehend impermeabel. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, nimmt das negative Potential bei dem vergeblichen Versuch, die Antihistaminika auszuwaschen, häufig sogar noch zu. Die Bindung der Antihistaminika an der Kollodium-Membran ist demnach anscheinend fast noch fester als bei den sypathikolytischen und anticholinergischen Stoffen; das gleiche gilt auch für die Antihistaminkörper Phenergan, Synopen und Neoantergan.

Tabelle 2. *Der Einfluß von Koniin, Veratrin, Nikotin sowie von lokalanästhetischen Substanzen und Azetylcholin-Antagonisten auf das Potential der Kollodium-Membran.*

Substanz	Ausgangs-Potential mV	Maximale Potentialänderung Endwert mV	Maximale Potentialänderung Nach Min.	Potentiale nach Auswaschung mV 5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
Koniin . . .	+ 30	— 9	35	+ 24	+ 26	+ 28	+ 30	+ 30	+ 30
Veratrin* . . .	+ 30	— 37	15	— 20	— 5	0	+ 8	+ 14	+ 20
Nikotin . . .	+ 30	— 23	15	— 4	0	+ 6	+ 10	+ 11	+ 12
Kokain . . .	+ 37	— 22	20	— 20	— 20	— 19	— 19	— 18	—
Novocain . .	+ 26	— 28	34	— 20	— 15	— 15	— 20	— 20	—
Pantocain . .	+ 30	— 20	44	— 20	— 10	— 15	— 20	— 20	—
Tutocain . .	+ 25	— 21	15	— 25	— 20	— 21	— 21	— 21	—
Panthesin . .	+ 28	— 15	90	— 13	— 13	— 10	— 9	— 10	—
Percain . . .	+ 26	— 8	45	— 4	— 4	— 4	— 4	— 4	—
Comp. 600 .	+ 28	— 28	90	— 15	— 13	— 14	— 15	— 15	— 15
„ 606.	+ 28	— 25	15	— 19	— 18	— 19	— 19	— 19	— 19
„ 623 .	+ 30	— 11	125	— 4	— 3	— 3	— 1	— 1	— 1
„ 1565 .	+ 24	— 21	30	— 10	— 12	— 13	— 13	— 12	— 12
„ 1597 .	+ 25	— 22	20	— 12	— 12	— 11	— 14	— 15	— 16
d-Tubocurarin	+ 32	— 20	30	— 9	— 9	— 8	— 8	— 8	— 8

* Der 0,02 mol-Veratrin-Lösung wurde die Bruttoformel $C_{32}H_{49}NO_9$ zugrunde gelegt.

c) Lokalanästhetika. Auch die gewöhnlichen Lokalanästhetika (Kokain, Novocain, Pantocain, Tutocain, Panthesin, Percain) zeigen an der Kollo-

* Thephorin lag als saueres Tartrat vor.

dium-Membran eine außerordentlich große Haftfestigkeit: Beim Kontakt mit einer 0,02 molaren Lokalanästhetikum-Lösung schlägt daher das Potential rasch und irreversibel auf negative Werte um (vgl. Tab. 2).

Gewöhnliche Lokalanästhetika unterscheiden sich also an der Kollodium-Membran kaum von den Antihistaminkörpern und Azetylcholin-Antagonisten. Diese enge Verwandtschaft tritt auch im pharmakologischen Verhalten zutage; denn die Antihistaminika und Acetylcholin-Antagonisten besitzen fast regelmäßig lokalanästhetische Eigenschaften, während umgekehrt gewöhnliche Lokalanästhetika in geeigneter Konzentration auch Antihistamin- und Anti-Azetylcholin-Effekte aufweisen können.

V. Die adsorptive Bindung von weiteren Alkaloiden, Erdalkalichloriden und basischen Farbstoffen an der Kollodium-Membran.

Koniin macht einen mäßig starken Potentialumschlag (vgl. Tab. 2). Die Anlagerung an der Kollodium-Membran ist aber locker; denn schon durch einmaliges Auswaschen wird die selektive Kationen-Permeabilität — ähnlich wie nach der Adsorption von Histamin, sympathikomimetischen und cholinergischen Stoffen — wieder hergestellt. Nikotin und Veratrin haften etwas fester, doch ist auch diese Bindung — bei Veratrin etwas schneller als bei Nikotin — voll reversibel. Auch Koniin, Veratrin und Nikotin werden also lockerer gebunden als die gegen Koniin, Veratrin und Nikotin antagonistisch wirksamen lokalanästhetischen[11] Substanzen.

Papaverin und Morphin zeigen an der Kollodium-Membran ein dem Nikotin ähnliches Verhalten (vgl. Tab. 3). Dagegen hat Dolantin schon mehr den Charakter eines Lokalanästhetikums und läßt sich innerhalb der Beobachtungszeit von 30 min nicht aus der Membran entfernen. Innerhalb von 150 min ging jedoch das negative Potential auf den Nullpunkt zurück und nach 240 min waren die mit Dolantin behandelten Membranen wieder vorwiegend kationen-permeabel (ohne das Ausgangspotential zu erreichen). Die Kurve für die Adsorption von Dolantin ähnelt — am meisten von allen geprüften Substanzen — der Kurve von Atropin. Cliradon ist in seiner Affinität zur Kollodium-Membran zwischen Morphin und Dolantin einzuordnen. Sehr fest werden Chinin und Strychnin eingelagert.

Auch Mg^{++}-, Ca^{++}- und Ba^{++}-Ionen schlagen sich an der Kollodium-Membran nieder; in Abhängigkeit davon sinkt das positive Potential der Außenlösung in reversibler Weise auf niedere Werte ab; ein Potentialumschlag wurde bei Anwendung der Erdalkalichloride in einer Konz.

von 0,02 mol/l nie beobachtet*. Erhebliche Unterschiede zwischen den Affinitäten von Mg^{++}, Ca^{++} und Ba^{++} zur Membran waren nicht festzustellen; wechselseitige Verdrängungen dieser Erdalkali-Kationen an der lebenden Membran sind also gut erklärbar. Alkalikationen (0,02 mol NaCl bzw. RbCl) in der 0,01 mol KCl-Lösung senken das Potential nicht.

Tabelle 3. *Der Einfluß verschiedener Alkaloid-, Alkali- und Erdalkali-Chloride auf das Potential der Kollodium-Membran.*

Substanz	Ausgangs-Potential mV	Maximale Potentialänderung Endwert mV	Maximale Potentialänderung Nach Min.	Potentiale nach Auswaschung mV 5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
Morphin . . .	+ 43	— 22	20	— 5	0	+ 7	+ 12	+ 15	+ 16
Papaverin . .	+ 38	— 15	45	0	+ 5	+ 11	+ 15	+ 17	+ 19
Cliradon . . .	+ 30	— 25	2	— 13	— 8	0	+ 3	+ 3	+ 3
Dolantin . .	+ 33	— 23	20	— 23	— 22	— 22	— 16	— 16	— 15
Chinin . . .	+ 26	— 26	40	— 10	— 14	— 15	— 16	— 16	— 17
Strychnin . .	+ 30	— 23	30	— 17	— 18	— 17	— 17	— 17	— 17
$MgCl_2$	+ 37	+ 12	45	+ 32	+ 36	+ 40	—	—	—
$CaCl_2$	+ 38	+ 5	45	+ 30	+ 29	+ 30	—	—	—
$BaCl_2$	+ 40	+ 8	45	+ 23	+ 28	+ 34	—	—	—
NaCl	+ 34	+ 35	30	+ 35	—	—	—	—	—
RbCl	+ 28	+ 32	30	+ 32	—	—	—	—	—

In Anbetracht der häufigen Verwendung *basischer Farbstoffe* bei der Herstellung selektiv anionen-permeabler Kollodium-Membranen wurde auch die Adsorption von Auramin, Neutralrot, Safranin, Malachitgrün, Methylviolett, Methylenblau, Rhodamin B, Rivanol und basischem Fuchsin geprüft. In einem Teil dieser Versuche war eine Farbstoffkonzentration von 0,02 mol/l wegen ungenügender Wasserlöslichkeit in der 0,01 mol-KCl-Lösung nicht möglich. Im ganzen gesehen sind die Ergebnisse bei der Farbstoffadsorption weniger durchsichtig als bei der Bindung von Alkaloiden: Die meisten Farbstoffe führten zwar zu einer Senkung des Potentials — einige in 0,02 molarer Konzentration auch zu einem Potential-Umschlag — die Resultate waren aber nicht selten beim gleichen Farbstoff unter Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen von Membran zu Membran verschieden. Trotz

* Die antagonistische Wirkung von Ca^{++} gegenüber Veratrin könnte — beurteilt nach den beträchtlichen Affinitäts-Unterschieden zur Kollodium-Membran — nur schwer als Verdrängung von Veratrin durch Calcium gedeutet werden. Nach der Auffassung von Welsh u. Gordon sowie Shanes (vgl. J. of Gen. Physiol. **33**, 57 (1949)) soll der Veratrin-Effekt auf einer spezifischen Störung der „Recalcification" der Membran-Oberfläche nach einer Erregung beruhen. Ein Überangebot von Ca^{++} könnte eine solche Störung bis zu einem gewissen Grad beseitigen, ohne einen direkten Verdrängungs-Effekt gegenüber Veratrin auszuüben. Verständlich wäre aus der Lage der Adsorptions-Diagramme, daß Ca^{++} am M.rectus gegen Coniin deutlich, gegen Acetylcholin schwach und gegen Nicotin fast gar nicht antagonistisch wirkt (vgl. Fleckenstein, Wagner und Göggel[11]).

mancher noch bestehender Unklarheiten ergab sich jedoch deutlich, daß einige dieser Farbstoffe ähnlich starke Affinitäten zur Kollodium-Membran besitzen wie die Lokalanästhetika*.

Besprechung.

Die Hofmeisterschen Quellungsversuche[14] an Gelatinestückchen haben zur Genüge gezeigt, daß das Verständnis komplizierter biologischer Phänomene auch durch Studien an einfachen unbelebten Systemen entscheidend gefördert werden kann. Der bessere Einblick in das Grundsätzliche, den derartige unbelebte Systeme gewähren, wiegt dabei nicht selten den Mangel an Differenziertheit auf, der jeder modellmäßigen Darstellung eines Lebensprozesses anhaftet.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden für zahlreiche pharmakologisch aktive Alkaloid-Kationen die natürlichen Affinitäten zu einer negativ geladenen Modell-Membran vergleichend gemessen. Das Ergebnis dieser Prüfung ist im Prinzip eindeutig: *Die Adsorption an der unbelebten Kollodium-Membran vollzieht sich offensichtlich nach ähnlichen Gesetzmäßigkeiten wie sie auch für den pharmakologischen und physiologischen Wirkungscharakter der Alkaloide am lebenden Objekt bestimmend sind:*

a) Adrenalin und sämtliche anderen geprüften Sympathikomimetika werden von der Kollodium-Membran viel weniger fest gebunden als Sympathikolytika (Yohimbin, Priscol, Dibenamin, Substanz 7337). Die physikalisch-chemischen Voraussetzungen für eine kräftige adsorptive Verdrängung der Sympathikomimetika durch Sympathikolytika sind also gegeben.

b) Auch Azetylcholin und verwandte Substanzen haften an der Kollodium-Membran nur locker. Am schwächsten wird Cholin adsorbiert. Dagegen sind die Azetylcholin-Antagonisten (Atropin, Parpanit, d-Tubocurarin, Trasentin und Verwandte) stark membran-affin.

c) Da Adrenalin und die Sympathikomimetika einerseits, Azetylcholin und die Azetylcholin-Verwandten andererseits an die Kollodium-Membran locker angelagert werden, ist eine wechselseitige Verdrängung von sympathiko-mimetischen und cholinergischen Stoffen auch am lebenden Organ verständlich.

d) Die Bindung von Histamin an der Kollodium-Membran ist beim Auswaschen augenblicklich reversibel, dagegen lassen sich Antihista-

* Von besonderem Interese ist, daß auch basische Farbstoffe am M. rectus des Frosches teilweise hochaktive Azetylcholin- und Nikotin-Antagonisten sind (Fleckenstein und Jochem[9]). Methylgrün ist z. B. gegen Azetylcholin 100mal stärker wirksam als Novocain. Mit abnehmender Stärke ergibt sich etwa folgende Reihe: *Methylgrün > Auramin > bas. Fuchsin > Nilblau > Safranin > Rivanol > Novocain > Methylenblau.* Ein derartiger Azetylcholin-Antagonismus ist bisher anscheinend nur für Methylenblau beschrieben (vgl. Cook[4], Clark[3]).

BOSTON
NOV 3 1952
MEDICAL LIBRARY

minika (Antistin, Pyribenzamin, Thephorin, Soventol) durch Waschen mit Aqua dest. und KCl-Lösung nicht mehr aus der Membran entfernen.

e) Pilokarpin und Atropin, die sich im Organismus wechselseitig verdrängen dürften, zeigen dementsprechend auch an der Kollodium-Membran ähnliche Haftfestigkeiten.

f) Koniin, Veratrin und Nikotin lagern sich ebenfalls relativ locker in die Poren der Kollodium-Membran ein. Im Gegensatz dazu werden sämtliche Lokalanästhetika — entsprechend ihrer starken, gegen Koniin, Veratrin und Nikotin gerichteten Wirkungen — praktisch irreversibel an den Porenwandungen fixiert.

g) Auch andere Substanzen mit lokalanästhetischen Effekten (Cliradon, Atropin, Dolantin) lassen sich durch länger dauernde Spülung und Aufenthalt in KCl-Lösung nur sehr schwer aus der Kollodium-Membran entfernen.

BOSTON MEDICAL LIBRARY MAY 1967

Die vorliegenden Untersuchungen erlauben also die *Aufstellung einer natürlichen Adsorptionsreihe der Alkaloid-Kationen, wobei die Agonisten (Sympathikomimetika, cholinergische Stoffe, Histamin, Koniin, Nikotin, Veratrin) geringere Affinitäten zur Kollodium-Membran zeigen als die ausgesprochenen Antagonisten.* Auch an der lebenden Zellmembran scheint sich also die Stärke der wechselseitigen Verdrängung aus den natürlichen physikalisch-chemischen Affinitäten dieser positiv geladenen Alkaloid-Kationen zu negativen Gruppen an der Oberfläche — wenigstens in den Grundzügen — zu erklären. *Unsere Ergebnisse lassen demnach vermuten, daß auch die Natur des Rezeptors an der Zellmembran im wesentlichen durch seine negative Ladung gekennzeichnet ist.*

Von Clark[3] werden als Rezeptoren für Azetylcholin an der Zellmembran vor allem Karboxylgruppen ($R — COO^-$) diskutiert. Von Beutner, Caplan und Loehr[2] sind auch im Kollodium derartige saure Gruppen nachgewiesen worden. Meyer und Sievers[17] denken außerdem an halbveräthertе Schwefelsäurereste, die während des Herstellungsprozesses in die Nitrozellulose gelangen und ebenfalls zur negativen Porenlandung der Kollodium-Membran beitragen können. Dagegen sieht Wilbrandt[24] die Ursache der Negativität in dem Dipolmoment der NO_3-Gruppen der Nitrozellulose; da das äußere Ende dieser Gruppe negativ ist, könnte sich die Porenladung aus der Lage dieser Gruppen gegen das Porenlumen zu erklären.

Die Kollodium-Membran ist zweifellos ein grobes Modell der natürlichen Zellmembranen. Eine spezifische Auswahl unter den adsorbierbaren Alkaloid-Kationen kann von den Rezeptoren der Kollodium-Membran nicht getroffen werden; die Verhältnisse sind daher viel weniger kompliziert als an lebenden Membranen. Vor allem enthält die Kollodium-Membran im Gegensatz zur Zellmembran keine lipoiden Substanzen. Die Lipoid-Affinität von Alkaloid-Kationen spielt daher bei der Anlagerung an die Rezeptoren der Kollodium-Membran vermutlich keine Rolle. An der lebenden Membran sind aber wahrscheinlich auch solche Löslichkeits-

Effekte von Bedeutung. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß die Spezifität der natürlichen Membran-Rezeptoren u. a. auch mit der komplizierten Lipoid-Struktur der Membranen (Mosaik-Membran) zusammenhängt.

Ein Hinweis auf die Beeinflussung der Alkaloid-Adsorption durch Lipoide ergibt sich aus Beobachtungen von Eichholtz, Staab und Taugner[6] am M. rectus abdom. des Frosches, dessen Ansprechbarkeit auf Azetylcholin z. B. durch geringe Mengen Desoxycorticosteronazetat herabgesetzt oder aufgehoben wird. Die weitere Prüfung dieses Effektes (Fleckenstein und Jochem[9]) hat auch für Cortison, Testosteron, Östradiol und Cyren A einen starken inhibitorischen Effekt gegen Azetylcholin und Nikotin gesichert. Die genannten Steroide hemmen nach 10 min Einwirkung in einer Konz. von 10^{-4}—10^{-5} mol/l die Azetylcholin-Kontraktur (1 : 10000) des M. rectus abdom. schon sehr deutlich. Progesteron scheint von den geprüften Steroidhormonen am wirksamsten zu sein.

Gewöhnliche Lokalanästhetika sowie die lokalanästhetischen Antihistaminkörper und Azetylcholin-Antagonisten zeigen als gemeinsame Eigenschaft eine auffällig starke Haftfestigkeit an der Kollodium-Membran. Diese Besonderheit gewinnt dadurch noch an Interesse, daß auch die stark haftenden Sympatholytika Dibenamin, Priscol, Yohimbin und Substanz 7337 bei intrakutaner Injektion — teilweise nach einer kurzen Schmerzphase — lokalanästhetisch sind (Taugner[22]); das gleiche gilt auch für Chinin und Strychnin*, die ebenfalls praktisch irreversibel adsorbiert werden. *Das einfachste physikalisch-chemische Charakteristikum eines lokalanästhetischen Alkaloid-Kations ist also die hohe Affinität zu den negativen Porenwandungen der Kollodium-Membran.* In Abhängigkeit von dieser Bindung wird die Kollodium-Membran für Kationen wie K^+ und Na^+ praktisch irreversibel gedichtet. Wir glauben, daß sich hieraus ein wichtiger Hinweis auf den Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika an Nerv und Muskel ergibt; denn die Aufhebung der Erregbarkeit durch Lokalanästhetika ist nach unseren vorausgegangenen Untersuchungen[7, 8, 11, 12] auf die Behinderung des K^+- und Na^+-Austausches als Grundprozeß der Erregung zurückzuführen. *Es bestehen gute Gründe zu der Annahme, daß die freie Passage für K^+ und Na^+ an der erregten Membran durch Lokalanästhetika auf ähnliche Weise blockiert wird, wie an der Kollodium-Membran; fest eingelagerte Alkaloid-Kationen werden auch in den Poren der Zellmembran die Beweglichkeit der viel mobileren K^+- und Na^+-*

* Schon in der älteren Literatur wird berichtet, daß Strychnin bei lokaler Applikation am Reflex-Frosch bzw. an der Zungenspitze die Sensibilität für mechanische bzw. faradische Schmerzreize herabsetzt, die Leitfähigkeit des motorischen Nerven unterbricht und den lokalanästhetischen Kokaineffekt verstärkt (vgl. E. Poulsson, Heffters Handb. exper. Pharmakol. Bd. II, 1, S. 359, 371). Nach eigener Beobachtung verursacht Strychnin. hydrochlor. (0,5% in Ringer-Lösung) bei intrakutaner Injektion volle Lokalanästhesie; eine Azetylcholin-Kontraktur des Froschrektus wird durch Konz. 1 : 800—1 : 1000 ebenfalls weitgehend unterdrückt.

Ionen herabsetzen. Die vorliegenden Befunde weisen jedenfalls darauf hin, daß der Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika mit der auffällig starken Haftfestigkeit dieser Kationen zusammenhängt; d. h. auf rein physikalisch-chemischer Grundlage erklärt werden muß. Eine nähere Darstellung dieser Probleme wird an anderer Stelle gegeben werden.

Eine bisher ungelöste Frage ist, warum diese Dichtung für Kationen an der lebenden Membran ohne Veränderung des Ruhepotentials zustande kommt. Auch die Frage der rückläufigen Verdrängung stark haftender Alkaloid-Kationen durch einen Überschuß weniger membran-affiner Alkaloid-Kationen bedarf noch einer näheren Untersuchung. Eine Reihe von Konsequenzen, die sich möglicherweise hinsichtlich der „competitive inhibition" an lebenden Organen ergeben, müssen ebenfalls noch experimentell geklärt werden.

Zusammenfassung.

Die Antagonismen zwischen Alkaloid-Kationen (Adrenalin-Sympatholytica, Acetylcholin-Atropin, Acetylcholin-Lokalanästhetica, Pilocarpin-Atropin, Histamin-Antihistaminica usw.) beruhen vermutlich auf dem Prinzip der „competitive inhibition"; dabei ist anzunehmen, daß die ausgesprochenen Antagonisten jeweils eine stärkere Affinität zum gemeinsamen Rezeptor an der Zellmembran besitzen als der verdrängte Stoff. Völlig unklar war aber bisher, ob die Festigkeit dieser Alkaloidbindung bei den einzelnen Substanzen bestimmten physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten folgt, bzw. ob die Festigkeit dieser Bindung schon von der natürlichen Adsorptions-Affinität der Alkaloid-Kationen zu einer negativen Oberfläche abhängt. Um die Alkaloid-Adsorption am Modell fortlaufend messen zu können, wurde ein neues elektrisches Meßverfahren an der Kollodium-Membran ausgearbeitet. Im einzelnen ergab sich:

1. Sympathikomimetika, Azetylcholin und Verwandte, Histamin, Koniin, Veratrin, Nikotin werden von der Kollodium-Membran locker und in reversibler Weise gebunden. Dagegen haften Sympatholytika, Azetylcholin-Antagonisten, Antihistaminika, Lokalanästhetika außerordentlich fest; die Agonisten haben also zur Kollodium-Membran geringere Affinitäten als die entsprechenden Antagonisten.

2. Die gewonnenen Meßergebnisse erlauben die Aufstellung einer *natürlichen Adsorptionsreihe* der Alkaloid-Kationen nach Maßgabe der Bindungsaffinitäten an den negativen Rezeptoren der Kollodium-Membran. Die Stärke der gegenseitigen Verdrängung an der lebenden Zellmembran wird anscheinend in erster Linie durch diese natürlichen Affinitäten der Alkaloid-Kationen zu einer negativ geladenen Oberfläche bestimmt. Ob die höhere Spezifität der Rezeptoren an der lebenden Membran u. U. damit zusammenhängt, daß außer Adsorptions-Affinitäten auch Lösungs-Affinitäten der Alkaloid-Kationen zu berücksichtigen sind, muß weiter geklärt werden.

3. Sämtliche lokalanästhetisch wirksamen Alkaloid-Kationen zeigen eine starke Haftfestigkeit und dichten die Kollodium-Membran für den Durchtritt von K^+ und Na^+ praktisch irreversibel ab. Da die Grundwirkung der Lokalanästhetika nach vorausgegangenen Untersuchungen auf der Blockierung des K^+- und Na^+-Austauschs bei der Nerven- und Muskelerregung beruht, gibt die Kollodium-Membran auch diesen Effekt modellmäßig wieder.

Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz danken wir sehr für die vielseitige Förderung der vorliegenden Arbeit.

Für die liebenswürdige Überlassung von Substanzen sind wir den folgenden Firmen sehr zu Dank verpflichtet: Bayer (Leverkusen), Boehringer-Sohn (Ingelheim), Ciba (Wehr-Baden), Farbwerke Höchst, Geigy (Basel), Deutsche Hoffmann-la Roche A.G. (Grenzach), Knoll (Ludwigshafen), Merck (Darmstadt), Sterling Drug Inc. (Rensselaer New York).

Literatur.

[1] Abrams, I., u. K. Sollner: J. gen. Physiol. **26**, 369 (1943). — [2] Beutner, R., M. Caplan a. W. M. Loehr: J. of biol. Chem. **101**, 391 (1933). — [3] Clark, A. H.: Heffters Handb. exper. Pharm., Erg.-Werk Bd. 4. Berlin 1934. — [4] Cook, R. P.: Brit. J. Physiol. **62**, 160 (1926). — [5] Cushny, A. R.: Brit. J. Physiol. **30**, 176 (1903). — [6] Eichholtz, F., A. Staab u. R. Taugner: Arch. internat. Pharmacodynamie (im Druck). — [7] Fleckenstein, A.: Pflügers Arch. **250**, 643 (1948); **253**, 321 (1951). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 54 (1950). — [8] Fleckenstein, A., u. A. Hardt: Klin. Wschr. **27**, 360 (1949). — [9] Fleckenstein, A., u. G. Jochem: unveröffentlicht. — [10] Fleckenstein, A., R. Muschaweck u. F. Bohlinger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 132 (1950). — [11] Fleckenstein, A., E. Wagner u. K. H. Göggel: Pflügers Arch. **253**, 38 (1950). — [12] Hardt, A., u. A. Fleckenstein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 39 (1949). — [13] Harkewitsch, N. K.: Kolloid-Z. **47**, 101 (1929). — [14] Hofmeister, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **25**, 1 (1888); **28**, 210 (1891). — [15] Jung, F.: Klin. Wschr. **21**, 1030 (1942). — [16] Lands, A. M., K. Z. Hooper, H. M. McCarthy a. R. F. Feldkamp: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **66**, 452 (1947). — [17] Meyer, K. H., u. J. F. Sievers: Helvet chim. Acta **19**, 649, 665 (1936). — [18] Michaelis, L., u. A. Fujita: Biochem. Z. **161**, 47 (1925). — [19] Mond, R., u. F. Hoffmann: Pflügers Arch. **220**, 194 (1928). — [20] Moratschek, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 278 (1944). — [21] Schaefer, H.: Elektrophysiologie Bd. I. Wien 1940. — [22] Taugner, R.: unveröffentlicht. — [23] Teorell, T.: J. gen. Physiol. **19**, 917 (1936). — [24] Voigt, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 282 (1944). — [25] Wilbrandt, W.: J. gen. Physiol. **18**, 933 (1935).

Dozent Dr. A. Fleckenstein, z. Z. Oxford, Dept. of Pharmacology.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 55—58 (1951).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. M. Schneider).

Über die adrenolytische Wirkung aralkylierter Adrenalin-Derivate an der Samenblase des Meerschweinchens.

Von
N. Ludwigs und K. Wiemers.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. Juni 1951.)

In einer früheren Mitteilung wurde gezeigt, daß das von Külz entwickelte N-(Phenyl-sek. butyl)-Derivat des p-Oxyephedrins (Dilatol*) unter geeigneten Bedingungen beim Hund die blutdrucksteigernde Wirkung des Adrenalins abschwächt. Der Effekt ist nicht nur bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen zu beobachten, sondern auch dann, wenn Adrenalin erst nach Rückkehr des durch Dilatol gesenkten Blutdrucks zum Ausgangswert injiziert wird. Es kann daher vermutet werden, daß die Substanz außer der sympathikomimetisch-inhibitorischen Wirkung — die bei gleichzeitiger Gabe mit dem vasokonstriktorischen Effekt des Adrenalins konkurrieren könnte — noch eine statische, adrenergisch-blockierende (im folgenden der besseren Lesbarkeit wegen auch als „adrenolytisch" bezeichnete) Wirkung besitzt. Diese Frage soll hier an einem geeigneteren Objekt untersucht werden.

Methodik.

Zur Prüfung auf adrenolytische Effekte hat Rothlin die isolierte Samenblase des Meerschweinchens eingeführt und ihre hohe Empfindlichkeit für die adrenalinhemmende Wirkung der Mutterkornalkaloide nachgewiesen. Wir hielten uns an die von Brügger weiter ausgearbeitete Methodik, die quantitative Vergleichsuntersuchungen gestattet. — Die Samenblasen von insgesamt 40 Meerschweinchen im Gewicht von 360—520 g wurden bei 38° C in sauerstoffdurchperlter Ratten-Ringer-Lösung nach Warburg (mit $1^0/_{00}$ Glukosezusatz) suspendiert. Im Abstand von 20 min wurde Adrenalin in einer Endkonzentration von 10^{-6} zugesetzt und nach Abklingen der Erregung wieder ausgewaschen. Meist war die Kontraktionshöhe von der 3. Adrenalingabe ab konstant und blieb es, wie Kontrollversuche zeigten, für die Dauer einiger Stunden. Bei Zusatz anderer Substanzen (deren Menge gleichfalls als Endkonzentration angegeben ist) wurde bis zur nächsten, 20 min später erfolgenden Adrenalingabe nicht ausgewaschen.

Die nach Zusatz der Prüfsubstanzen erhaltenen Adrenalin-Kontraktionen wurden in % der ursprünglichen Hubhöhe ausgedrückt. Wir legten dabei den Mittelwert zugrunde aus der ersten Kontraktion, die noch bei gleichzeitiger Anwesenheit

* Hersteller Tropon-Werke Köln-Mülheim.

der Prüfsubstanz erfolgte, und der zweiten, vor der die Prüfsubstanz bereits ausgewaschen war. Im Durchschnitt der Versuche vollzog sich die Rückkehr zur alten Hubhöhe bei unseren Substanzen etwa gleichmäßig während der drei nachfolgenden Adrenalingaben.

Ergebnisse.

Phenyl-sek. butyl-nor-Suprifen (Dilatol) hat in den geprüften Konzentrationen (10^{-8} bis 10^{-4}) an der Samenblase keine Eigenwirkung. Auf nachfolgende Adrenalingaben hat die Substanz in der Konzentration 10^{-8} noch keinen deutlichen Einfluß, während durch 10^{-7} die Wirkung der zugesetzten Testdosis bereits stark gehemmt wird. Bei 10^{-6} wird die volle Adrenalinwirkung erst nach 2—3maligem Auswaschen wieder erreicht (Abb. 1). Die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 2) erstreckt sich über

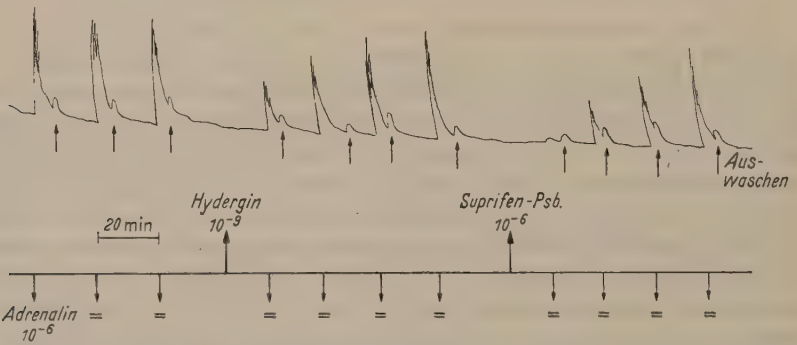


Abb. 1. Die adrenolytische Wirkung von Dilatol an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens, verglichen mit Hydergin. Die kleinen Pfeile bedeuten jeweils Auswaschen der zuvor gegebenen Adrenalinlösung (Endkonzentration 10^{-6}).

drei Zehnerpotenzen. Für das Phenyl-sek. butyl-Derivat des Sympatols erhielten wir eine Dosis-Wirkungskurve, die sich mit derjenigen von Dilatol nahezu deckt. Das entsprechende Adrenalin-Derivat, dessen Kreislaufwirkung 50—100mal stärker ist als die von Dilatol, hemmt bei der ersten Adrenalingabe etwa gleichstark wie diese beiden Verbindungen, zeigt aber nach dem ersten Auswaschen kaum mehr eine Wirkung, wahrscheinlich, weil es schneller zerstört wird.

Zur Ermittlung der für die adrenolytische Wirkung erforderlichen chemischen Struktur wurden zwei Sympathikomimetika herangezogen, die an der Aminogruppe rein aliphatisch substituiert sind: Sek. butyl-nor-Suprifen (Dilatol ohne Phenylrest) und n-Butyl-nor-Sympatol („Vasculat"). Beide Substanzen ergeben Dosis-Wirkungskurven, die sich wiederum praktisch decken, aber gegenüber den vorigen in einen um zwei Zehnerpotenzen höheren Konzentrationsbereich verschoben sind. Unsere Ergebnisse mit Butylsympatol decken sich also im wesentlichen mit denen von Förster, Kuschinsky und Lüllmann.

Als bekannte Vergleichssubstanz diente das hydrierte Sekalepräparat „Hydergin", das in unseren Versuchen in Übereinstimmung mit Brügger in Konzentrationen zwischen 10^{-9} und 10^{-8} eine 50%ige Hemmung des Adrenalineffekts bewirkt und somit etwa 100mal wirksamer ist als die aralkylierten Derivate des p-Oxyephedrins und Sympatols.

Besprechung der Ergebnisse.

Die eingehenden Untersuchungen von Wirsing an der isolierten Samenblase haben gezeigt, daß Form und Steilheit der Dosis-Wirkungskurve einer antagonistischen Reaktion keine Charakteristika für eine

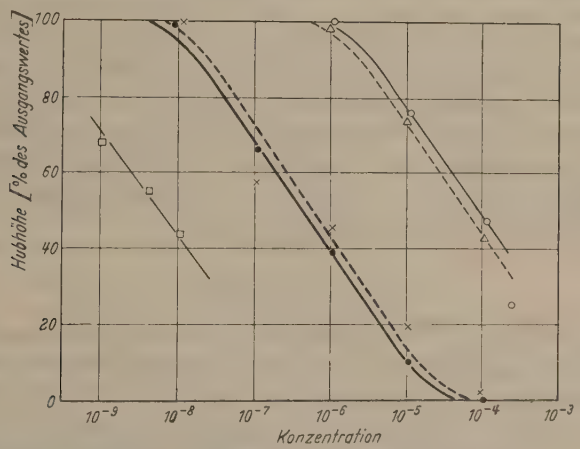


Abb. 2. Dosiswirkungskurve für die antagonistische Wirkung verschiedener Substanzen gegenüber Adrenalin 10^{-6} an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens.

o—o Hydergin.
•—• Dilatol.
×----× Phenyl-sek. butyl-nor-Sympatol.
△----△ Butyl-nor-Sympatol (Vasculat).
o—o Sek. butyl-nor-Suprifen.

Spezifität dieser Reaktion aufweisen. Somit kann zunächst nur aus dem quantitativen Verhältnis zwischen dem Agonisten Adrenalin und dem geprüften Antagonisten auf die Spezifität der adrenolytischen Wirkung geschlossen werden. Von den hochwirksamen Mutterkornalkaloiden sind 60—1800mal weniger Moleküle als von Adrenalin erforderlich, um die Wirkung des letzteren auf die Samenblase zu hemmen (Brügger). Dilatol und Phenyl-sek. butyl-nor-Sympatol hemmen die Wirkung einer 20fach höheren molaren Konzentration von Adrenalin, und zwar auch nach einmaligem Auswaschen. Die Dosis-Wirkungskurve verläuft nahe derjenigen, die Wirsing für das als spezifisch anzusehende Antagonistenpaar Adrenalin/Ciba 7337 gefunden hat (bei seinen Versuchen wurde allerdings eine höhere Adrenalinkonzentration, 3,2mal 10^{-6}, angewandt). Bei unserer mangelhaften Kenntnis über die verschiedenen Rezeptoren können auf Grund solcher Zahlenverhältnisse über die Vorgänge

zwischen Pharmakon und Substrat nur Vermutungen aufgestellt werden. Für den Nachweis einer wirklichen Spezifität des Antagonisten im Sinne einer Reaktion mit dem adrenergischen Rezeptor (vgl. hierzu Meier und Bein) müßte gezeigt werden, daß Azetylcholin und Histamin noch voll wirksam sind bei Dilatol-Konzentrationen, welche die Adrenalin-Wirkung hemmen. Bei Sek.-butyl-nor-Suprifen und Butyl-Sympatol ist man wohl nicht zur Annahme einer spezifischen adrenergisch-blockierenden Wirkung berechtigt, da die Dosis-Wirkungskurven dieser Substanzen im gleichen Konzentrationsbereich verlaufen wie etwa die des Antagonistenpaares Adrenalin/Atropin (nach Wirsing).

Man darf annehmen, daß der zweite Phenylrest entscheidend ist für die deutlich adrenolytische Wirkung der aralkylierten Sympathikomimetika an der Samenblase, und daß Veränderungen in der chemischen Struktur des sympathikomimetischen Grundkörpers demgegenüber von geringer Bedeutung sind. Der adrenergisch-blockierende Effekt ist aber an den meisten Organen schwächer als die sympathikomimetisch-inhibitorische Eigenwirkung, so daß vor allem die gefäßerweiternde Wirkung nicht als sympathikolytisch aufzufassen ist.

Zusammenfassung.

Phenyl-sek. butyl-nor-Suprifen (Dilatol) und das entsprechende N-aralkylierte Sympatol-Derivat hemmen an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens in Konzentrationen zwischen 10^{-8} und 10^{-5} die erregende Wirkung von Adrenalin 10^{-6} bzw. heben sie auf. Die Substanzen haben einen etwa 100 mal schwächeren adrenolytischen Effekt als Hydergin, wirken aber 100 mal stärker als analoge Verbindungen, denen der zweite Benzolring fehlt. Eine Eigenwirkung besitzen die aralkylierten Substanzen an der Samenblase nicht; vermutlich haben sie einen blokkierenden Effekt auf die adrenergischen Rezeptoren, für den der zweite Phenylrest verantwortlich zu machen ist.

Literatur.

Brügger, J.: Helvet. physiol. Acta **3**, Fasc. 1 (1945). — Förster, W., G. Kuschinsky u. H. Lüllmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 23 (1950). — Külz, F., u. M. Schneider: Klin. Wschr. **1950**, 535. — Meier, R., u. H. J. Bein: Biochim. et Biophys. Acta **4**, 144 (1950). — Rothlin, Klin. Wschr. **1925**, 1437. — Wiemers, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 283 (1951). — Wirsing, F.: Inaugural-Diss. Basel 1949.

Dr. Kurt Wiemers, Köln-Lindenthal, Leiblplatz 2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 59—66 (1951).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Fischer).

Toxizität und Wirkung einiger Thiuramdisulfidverbindungen auf den Alkoholstoffwechsel*.

Von
D. Kirchheim.

(Eingegangen am 25. Mai 1951.)

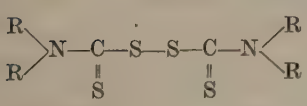
Bei Arbeitern einer hiesigen Vulkanisierungsfirma, die in gewerbliche Berührung mit Tetramethyl-thiuramdisulfid kommen, zeigten sich nach Genuß von Alkoholika unangenehme Vergiftungserscheinungen (hochroter Kopf, starke Übelkeit). Die immer ausgedehntere Verwendung von Thiuramdisulfid-Derivaten als Fungicide, Insekticide und besonders als Vulkanisierungsmittel ließen es deshalb als angezeigt erscheinen, die Giftigkeit und Wirkung einiger Substanzen dieser Körperklasse, von denen bisher nur die als „Antabus" benannte Tetraäthylverbindung eingehender untersucht worden ist, zu studieren.

Hald, Jacobsen und Larsen[20] zeigten, daß Tetraäthylthiuramdisulfid (Antabus) den Organismus gegen Alkohol sensibilisiert. Wurde nach vorheriger Antabusverabreichung Alkohol getrunken, so kam es neben Gefäßerweiterung (besonders im Gesicht), Puls- und Atembeschleunigung, Übelkeit und Erbrechen zu einer deutlichen Erhöhung der Azetaldehydkonzentration im Blut. Da nach Azetaldehydinfusion ungefähr gleiche Symptome ausgelöst werden konnten, sind diese sehr wahrscheinlich Folge der erhöhten Azetaldehydkonzentration (Asmussen, Hald und Larsen[4]; vgl. auch Hald et al.[25], Stotz[47], Hald und Jakobsen[21], Asmussen et al.[4], Jones[30], Larsen[33], Hald et al.[23], Jakobsen und Larsen[27], Lubin und Westerfeld[40], Kjeldgaard[31], Edwards[15], Jakivartio[29], Lecoq[35], Delay et al.[12]).

In dieser Arbeit werden außer Antabus noch 4 andere Thiuramdisulfide auf Toxizität und Einfluß auf die Blutazetaldehydkonzentration nach Alkoholgaben beim Kaninchen untersucht.

Tetramethylthiuramdisulfid (TM) und Tetraäthylthiuramdisulfid (TA) wurden uns freundlicherweise von der Chemischen Fabrik Starck (Zürich) zur Verfügung gestellt. Dipiperidylthiuramidsulfid (DP), Dimethyl-Diphenylthiuramdisulfid (DM) und Diäthyl-Diphenylthiuramdisulfid (DA) wurden im Chemischen Laboratorium unseres Institutes durch Dr. Staub aus den sekundären Aminen synthetisiert.

Struktur der Thiuramdisulfide:



R kann eine Alkyl- oder Arylgruppe oder ein Piperidinrest sein.

* Vgl. auch Inaug.-Diss. gleichen Titels, Frankfurt a. M. 1951.

1. Toxizität.

Es wurde die Letaldosis 50 an weißen Mäusen mit einem Durchschnittsgewicht von 20 g bestimmt. Da alle 5 untersuchten Thiuramdisulfide in Wasser unlöslich sind, wurden sie in einer Emulsion per Magensonde verabreicht. Die Toxizität von TM wurde außerdem noch

Tabelle 1.

1a TM (peroral)			1b TM (intraabdominal)			
Zahl Mäuse	Dosis mg/g	Let.	Zahl Mäuse	Dosis mg/g	Let.	Zeitpunkt d. Todes nach Injektion
24	0,6	0/24	6	0,04	1/6	10 Std
12	0,8	1/12	13	0,06	4/13	1—2 Tage
54	1,0	13/54	16	0,08	11/16	½—2 Tage
60	1,2	20/60	6	0,1	5/6	½—1½ Tage
20	1,5	9/20	6	0,12	4/6	½—1 Tag
20	2,0	11/20	3	0,14	3/3	3—18 Std
12	2,5	10/12	6	0,2	6/6	3—10 Std
20	3,0	15/20	6	0,3	6/6	2—8 Std
20	4,0	19/20	3	0,4	3/3	70—110 min
			6	0,5	6/6	50—70 min

2 TA			3 DP		
Zahl Mäuse	Dosis mg/g	Let.	Zahl Mäuse	Dosis mg/g	Let.
6	4,0	0/6	6	2,0	0/6
12	5,0	1/12	6	4,0	1/6
12	6,0	0/12	12	5,0	5/12
10	8,0	3/10	12	6,0	7/12
12	10,0	5/12	6	8,0	4/6
12	12,0	6/12	6	10,0	5/6

4 DM			5 DA		
Zahl Mäuse	Dosis mg/g	Let.	Zahl Mäuse	Dosis mg/g	Let.
6	3,0	0/6	15	10,0	0/15
6	6,0	0/6			
6	8,0	0/6			
12	10,0	0/12			

bei abdominaler Applikation untersucht. Als Emulgator wurde Tween 20 benutzt, mit dessen Hilfe recht stabile Emulsionen hergestellt werden konnten. Bei den peroralen Versuchen war das Verhältnis Tween 20 zu Wasser 1 : 9, bei den intraabdominalen 1 : 19. In den Leerversuchen zeigte der Emulgator Tween 20 unter diesen Bedingungen keine toxischen Wirkungen.

Nach diesen Versuchen beträgt die LD^{50} an weißen Mäusen für TM etwa 1,5—2,0 g/kg, für DP etwa 5,0—6,0 g/kg, für TA etwa 12,0 g/kg bei peroraler Applikation. DM und DA erwiesen sich bis zu einer Dosis von 10,0 g/kg als nicht toxisch. Bei intraabdominaler Applikation ist TM etwa 20mal toxischer als bei peroraler Applikation. Die zugrunde gegangenen Tiere boten vor dem Exitus ähnliche Symptome, wie sie für das TA (Antabus) von Hald et al.[20] beschrieben wurden (Ataxie, Lähmungen, Nachlassen der Klammerkraft, und manchmal asphyktische Konvulsionen). Der Zeitpunkt des Todes lag bei den nach peroraler Verabreichung zugrunde gegangenen Tieren zwischen 24 und 96 Std nach Applikation der Dosis.

Nach Hanzlik und Irvine ist TM bei Kaninchen ungefähr 10mal giftiger als TA; die MLD. von TM beträgt beim Kaninchen 0,35 g/kg, bei Katzen 0,23 g/kg. Die MDL. von TA wird mit 3—4 g/kg angegeben.

2. Wirkung auf den Alkoholstoffwechsel.

A. Methodik.

Die Versuche wurden an ausgewachsenen Kaninchen von 2—3 kg K.G. durchgeführt. Die Tiere bekamen am Morgen des 1. Versuchstages 30 cm^3 10%igen Alkohol per Magensonde. Kurz davor und in gewissen Abständen danach (s. Tab. 2) wurden aus der Ohrvene Blutproben entnommen und diese nach der Methode von Stotz[47] auf Azetaldehydgehalt untersucht. Am Abend des 2. Versuchstages erhielten die Tiere eine Dosis eines der Thiuramdisulfide per Magensonde, 14 bis 18 Std danach (am Morgen des 3. Versuchstages) wurden wie am 1. Versuchstage vor und nach der Alkoholgabe die gleichen Bestimmungen ausgeführt. So konnten die Blutazetaldehydwerte nach Alkoholverabreichung vom unbehandelten (= Leerversuch am 1. Versuchstag) mit denen des behandelten Tieres (– Hauptversuch am 3. Versuchstag) verglichen werden. In der Tab. 2 stehen die Werte des Leerversuches immer unter denen des zugehörigen Hauptversuches des gleichen Tieres. Bei den hohen Dosen der Thiuramdisulfide waren keine Leerversuche notwendig. Um aber festzustellen, welche niedrigste Dosis eines Thiuramdisulfides noch eine steigernde Wirkung auf die Azetaldehydkonzentration ausübt, war es bei den niedrigen Dosen erforderlich, am gleichen Tier einen Leerversuch zu machen, da die Azetaldehydwerte in den Leerversuchen bei einigen Tieren 2—3mal so hoch als beim Durchschnitt waren. Ohne Leerwerte könnte man sonst leicht bei diesen Tieren die weit über dem Durchschnitt liegenden Azetaldehydwerte der Wirkung des Thiuramdisulfids zuschreiben. Diesen Fall demonstriert besonders Kaninchen Nr. 8, das die höchsten Leerwerte aufweist. Zur Kontrolle wurde bei diesem Tier 2 Tage später nochmals ein Leerversuch angestellt und der Hauptversuch erst am 5. Versuchstage durchgeführt. Beide Leerversuche zeigen größenordnungsmäßig gleich hohe Werte, die Werte des Hauptversuches liegen jedoch alle über den Leerwerten, so daß man mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen kann, daß in diesem Falle 25 mg/kg K.G. TM noch eine Wirkung hat. 15 Std vor den Alkoholgaben bekamen die Tiere nichts mehr zu fressen (ausgenommen die mit einem + versehenen Versuche).

B. Ergebnisse und Diskussion.

Von den 5 untersuchten Thiuramdisulfiden zeigen TM und TA eine deutliche Wirkung auf die Azetaldehydkonzentration nach Alkohol-

verabreichung. (Diese Wirkung wird im folgenden als „Azetaldehydeffekt" bezeichnet.) Da DM, DA und DP in keinem der Versuche größenordnungsmäßig höhere Azetaldehydkonzentrationen verursachte, als den Leerwerten entsprach, und TM und TA auch in viel niedrigeren Dosen in etwa 15 Versuchen nie den Azetaldehydeffekt vermissen ließen, ist

Tabelle 2.

1. Tetramethyl-thiuramdisulfid. F. 146° C.

Kan. Nr.	Dosis mg/kg	mg % Acetaldehyd im Blut Zeit nach 30 cc 10% Alkohol mit Magensonde									
		vor Alk.	10′	30′	1h	90′	2h	3h	5h	7h	20h
1	150[4]	—	—	—	2,26	—	2,84	—	—	2,71[2]	—
2	150[4]	0,14	1,46	1,60	2,90	—	2,90	3,30	3,91	5,94	0,31
3	50	0,12	1,47	2,54	2,34	—	2,24	1,64	1,04	—	—
	—	0,15	0,39	0,31	0,30	0,79	0,83	0,70	0,16	—	—
4	50	0,12	1,36	1,92	3,05	—	3,30	3,05	—	—	—
	—	0,11	0,50	0,66	0,66	—	0,37	0,25	0,10	—	—
5	25	0,15	1,05	1,58	1,25	1,58	—	—	—	—	—
	—	0,13	0,53	0,41	0,33	0,36	0,39	—	—	—	—
6	25	0,13	1,13	1,31	1,00	1,21	—	—	—	—	—
	—	0,13	0,63	0,52	0,33	0,35	0,37	—	—	—	—
7	25	0,12	0,97	1,14	1,45	—	1,27	—	—	—	—
	—	0,11	0,54	0,50	0,41	0,36	0,27	—	—	—	—
8	25	0,28	1,38	1,60	1,74	1,33	1,65	1,29	0,63[1]	—	—
	—	0,24	0,96	1,40	1,02	1,21	1,06	0,91	0,30[1]	—	—
	—	—	1,09	1,14	1,19	1,13	0,87	0,57	0,36[1]	—	—
9	25	0,16	0,72	0,96	1,19	1,08	0,93	—	—	—	0,14[1]
	—	0,11	0,54	0,50	0,41	0,36	0,27	—	—	—	—
10	12	0,19	0,39	0,82	0,55	0,57	0,51	0,61	0,31[1]	—	—

2. Tetraäthyl-thiuramdisulfid. F. 70—72° C.

Kan. Nr.	Dosis mg/g	mg % Acetaldehyd im Blut Zeit nach 30 cc 10 % Alkohol mit Magensonde									
		vor Alk.	10′	30′	1h	90′	2h	3h	5h	7h	20h
11	500[4]	—	—	—	2,03	—	2,46	—	—	2,88	—
12	150	0,12	0,57	0,99	1,60	—	0,86	0,90	0,60	1,00	0,54
13	50	0,13	1,28	1,18	0,81	0,37	—	—	—	—	—
	—[3]	0,18	0,65	0,42	0,51	0,33	0,35	—	—	—	—
14	50	0,15	1,06	1,47	0,84	0,55	—	—	—	—	—
	—	0,13	0,33	0,44	0,54	0,31	0,29	—	—	—	—
15	25	0,14	0,87	0,82	1,04	0,95	—	—	—	—	—
	—	0,13	0,68	0,75	0,81	0,52	—	—	—	—	—
16	25	0,17	0,39	0,23	0,43	0,53	0,22	0,20	—	—	—
17	25	0,21	0,64	0,71	0,44	0,43	0,32	0,39	0,21[1]	—	—
	—	—	0,64	0,53	0,42	0,39	0,35	0,21	0,14	—	—

3. Dimethyl-Diphenyl-thiuramdisulfid. F. 198° C.

Kan. Nr.	Dosis mg/g	mg % Acetaldehyd im Blut Zeit nach 30 cc 10 % Alkohol mit Magensonde									
		vor Alk.	10′	30′	1h	90′	2h	3h	5h	7h	20h
19	500	—	—	—	0,51	—	—	—	—	0,14[2]	—
20	500	—	—	—	0,39	—	0,23	—	—	0,14	—
21	150	0,12	0,41	0,48	0,55	—	1,13	0,91	0,34	—	—
	—	0,13	0,53	1,28	1,21	—	0,86	0,59	0,11	—	—
	50	0,12	0,60	0,82	0,50	—	0,49	0,63	0,20	—	—

4. Diäthyl-Diphenyl-thiuramdisulfid. F. 170—172° C.

Kan. Nr.	Dosis mg/g	mg % Acetaldehyd im Blut Zeit nach 30 ccm 10 % Alkohol mit Magensonde									
		vor Alk.	10′	30′	1h	90′	2h	3h	5h	7h	20h
22	500	—	—	—	0,49	—	0,20	—	—	0,18[2]	—
23	500	—	—	—	0,45	—	0,27	—	—	0,16[2]	—
24	150	0,14	0,21	0,26	0,39	—	0,31	0,25	0,16	—	—
25	50	0,26	1,05	1,06	1,25	—	—	0,88	0,25	—	—
	—	0,16	0,87	1,11	1,10	—	1,12	—	0,10	—	—

5. Dipiperidyl-thiuramdisulfid. F. 130—131° C.

Kan. Nr.	Dosis mg/g	mg % Acetaldehyd im Blut Zeit nach 30 cc 10 % Alkohol mit Magensonde									
		vor Alk.	10′	30′	1h	90′	2h	3h	5h	7h	20h
26	500	—	—	—	0,78	—	0,27	—	—	0,16	
27	500	—	—	—	0,59	—	0,39	—	—	0,14	
28	150[3]	0,16	0,27	0,27	0,39	—	0,94	0,76	0,98	—	
	—	0,12	0,42	0,82	0,76	—	0,91	—	0,29	—	
29	25	0,13	0,33	0,34	0,40	0,69	—	0,45	—	—	
	—	0,13	0,63	—	0,59	0,35	0,25	0,20	—	—	

[1] Nach 4 Std. — [2] Nach 9 Std. — [3] Nicht 15 Std vorher gefastet. — [4] Diese Kaninchen starben 2—4 Tage nach dem Versuch.

mit großer Wahrscheinlichkeit zu schließen, daß zumindestens unter diesen Versuchsbedingungen DM, DA und DP keine Antabuseigenschaften besitzen. TM zeigte den Azetaldehydeffekt noch in einer Dosis von 25 mg/kg, während er nach TA erst von einer Dosis von 50 mg/kg an klar zu erkennen war. Obwohl die Versuche deutlich zeigen, daß TM in kleineren Dosen als TA wirksam ist und z. B. nach 50 mg/kg TM Azetaldehydwerte von gleicher Größenordnung wie nach 500 mg/kg TA

auftreten, ist es bei der Schwankungsbreite in den Reaktionen der einzelnen Tiere gewagt, das Wirkungsverhältnis betreffs des Azetaldehydeffektes zwischen TM und TA quantitativ auszudrücken. Somit ist es im Hinblick darauf und die nicht so große Zahl der Versuche nicht möglich, einen therapeutischen Index von TA und TM auf Grund dieser Versuche aufzustellen. Wegen der hohen Toxizität hat TM trotz größerer Wirksamkeit kaum Vorzüge gegenüber TA in der Therapie der Alkoholiker. Außerdem liegt die Gefahr der Antabusbehandlung wohl weniger in der geringen Toxizität des TA, als in den toxischen Wirkungen des nach TA + Alkohol vermehrt auftretenden Azetaldehyds. Da die Behandlung der Alkoholiker aber gerade auf den Symptomen beruht, die durch die erhöhte Azetaldehydkonzentration hervorgerufen werden, ist es nur möglich, die Gefahren der Antabusbehandlung herabzusetzen, indem die Behandlung unter Kontrolle der Antabus- und Alkoholdosen in einem Krankenhaus stattfindet.

Da bei den vereinzelten Todesfällen (Edwards[15]) und toxischen Schädigungen (Raby[44]) abnorm hohe Azetaldehydkonzentrationen gefunden wurden und dies wahrscheinlich die Todesursache war, könnte man diese Gefahr vielleicht vermindern, indem vor jeder Antabusbehandlung der Azetaldehydeffekt nach sehr kleinen Dosen oder nur nach Alkohol bestimmt wird und nur die Pat. der Antabusbehandlung zugeführt werden, die einen größenordnungsmäßig „normalen" Azetaldehydeffekt aufweisen. Dieser Überlegung liegt die Voraussetzung zugrunde, daß die hohen Azetaldehydeffekte durch eine erhöhte individuelle Reaktionsfähigkeit (konstitutionell oder erworben) zustandekommen und nicht oder sehr selten auf vorübergehenden Stoffwechselzuständen (nach bestimmten Mahlzeiten usw.) beruhen und somit nur zeitweise auftreten und dann durch diese Vorprobe nicht erfaßt werden können. Diese Annahme stützen die Versuche an Kaninchen, da einige Tiere immer abnorm stark reagierten, obwohl alle Tiere gleiches Futter erhielten.) Falls die hier erörterte Voraussetzung richtig ist, ist die Antabusbehandlung (zusammen mit Psychotherapie) im Hinblick auf die Mitteilungen von Aitoff[1], Martensen-Larsen[41] und Jacobsen et al.[28] wenig gefährlich und positive Erfolge versprechend.

Das Ziel meiner Untersuchungen lag jedoch weniger in der Suche nach einem wirksamen, aber noch weniger toxischen „Antabus", als vielmehr darin, Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution der Thiuramdisulfide und dem Auftreten des Azetaldehydeffektes zu finden. Während die beiden niedersten aliphatischen Thiuramdisulfide diesen Effekt aufweisen, tritt er bei Ersatz der Radikale R (siehe Strukturformel auf S. 59) durch Benzol- (DM und DA) oder Piperidinreste nicht mehr auf.

Es wäre für die Frage der Beziehung zwischen chemischer Konstitution und Wirkung von Interesse, ob auch noch die höheren aliphatischen Thiuramdisulfide und unter diesen auch die Isoverbindungen den Azetaldehydeffekt hervorrufen, und ob es durch Substitution des Benzolringes oder Ersatz des Radikals *R* durch leichter aufspaltbare Ringe als Benzol, wie z. B. das durch Delay et al.[12] bereits beschriebene Morpholinderivat, zu einem Azetaldehydeffekt kommt.

Der sicher und nicht schwer festzustellende Azetaldehydeffekt eignet sich gut für die Untersuchung der Beziehung zwischen chemischer Konstitution und Wirkung bei Thiuramderivaten.

Zusammenfassung.

Die Toxizität und der Einfluß auf die Azetaldehydkonzentration im Blut nach Alkohol (Azetaldehydeffekt) von Tetramethyl- (TM), Tetraäthyl- (TA, Antabus), Dimethyl-Diphenyl- (DM), Diäthyl-Diphenyl- (DA) und Dipiperidyl-thiuramdisulfid (DP) wurden untersucht. Die LD_{50} (nach oraler Applikation) bei weißen Mäusen beträgt für TM 1,5—2,0 g/kg, für TA 12,0 g/kg und für DP 5,0—6,0 g/kg. DM und DA erwiesen sich bis zu einer Dosis von 12,0 g/kg als nicht toxisch.

Bei Kaninchen ist der Azetaldehydeffekt nach TM viel stärker als nach TA, nach DM, DA und DP trat er nicht auf.

Vor jeder Antabusbehandlung wird ein Probeversuch empfohlen, um die mit abnorm hohen Azetaldehydeffekten reagierenden und dadurch Zwischenfälle verursachenden Patienten von der Antabusbehandlung auszuschließen.

Literatur.

[1] Aitoff, V.: Semaine hôp. Paris **25**, 4033 (1949). — [2] Arruda, E.: Neurobiol (Recife) **12**, 267 (1949). — [3] Asmussen, E., J. Hald, E. Jacobsen u. G. Jorgensen: Acta Pharm. Tox. **4**, 297 (1948). — [4] Asmussen, E., J. Hald u. V. Larsen: Acta Pharm. Tox. **4**, 311 (1948). — [5] Bell, R. G., H. Smith u. Ward: Canad. med. Assoc. J. **60**, 286 (1949). — [6] Booij, J.: Geneesk. gids **27**, 465 (1949). — [7] Carver, A. E.: Brit. med. J. **1949**, 466. — [8] Chapuis, R., u. H. Solms: Schweiz. med. Wschr. **79**, 1149 (1949). — [9] Chauchard, P., H. Mazoué u. R. Lecoq: C. r. soc. Biol. Paris **143**, 1550 (1949). — [10] Conley, B. E.: Bull. Amer. soc. Hosp. Pharmacists **7**, 18 (1950). — [11] Cournot, L.: Semaine hôp. Paris **25**, 3141 (1949). — [12] Delay, J., P. Pichot u. J. Thuillier: Ann. méd. psychol. **107**, II, 315 (1949). — [13] Delay, J., P. Pichot u. J. Thuillier: Ann. méd. psychol. **107**, 427 (1949). — [14] Delay, J.: Presse méd. **58**, 13 (1950). — [15] Edwards, T. P.: Texas Rep. Biol. Med. **7**, 684 (1949). — [16] Eldjarn, L.: Acta chem. Scand. **3**, 644 (1949). — [17] Forssman, H.: Social. med. Tiskr. **26**, 186 (1949). — [18] Geill, T.: Mskr. prakt. Laegegern. Kbh. **27**, 438 (1949). — [19] Glud, E.: Quart. J. Alcohol **10**, 185 (1949). — [20] Hald, J., E. Jacobsen u. V. Larsen: Acta Pharm. Tox. **4**, 285 (1948). — [21] Hald, J., u. E. Jacobsen: Acta Pharm. Tox. **4**, 305 (1948). — [22] Hald, J., u. E. Jacobsen: Lancet **255**, 1001 (1948). — [23] Hald, J., E. Jacobsen u. V. Larsen: Acta Pharm. Tox. **5**, 179 (1949). — [24] Hald, J., u. V. Larsen: Acta Pharm. Tox. **5**, 292 (1949). — [25] Hald, J., E. Jacobsen u. V. Larsen: Acta Pharm. Tox. **5**, 298 (1949). — [26] Jacobsen, E.: Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) **4**, 330 (1950). — [27] Jacobsen, E., u. V. Larsen: Acta Pharm. Tox. **5**, 285 (1949). — [28] Jacobsen, E., u. O. Martensen-Larsen: J. Amer. med. Assoc. **139**, 918 (1949). — [29] Jokivartio: Acta Pharm. Tox. **6**, 107 (1950). — [30] Jones, R. O.: Canad. med. Assoc. J. **60**, 609 (1949). — [31] Kjeldgaard, N. O.: Acta Pharm. Tox. **5**, 397 (1949). — [32] Knutsen, B.: Tiskr. Norske Laegeforen. **69**, 436 (1949). — [33] Larsen, V.: Acta Pharm. Tox. **4**, 321 (1948). — [34] Lauritzen,

E., u. Knud Raby: Nordisk. Med. **42**, 1694 (1949). — [35] Lecoq, R.: C. r. Acad. Sci. Paris **229**, 852 (1949). — [36] Lecoq, R.: Thérapie **4**, 177 (1949). — [37] Lecoq, R., P. Chauchard u. H. Mazoué: Thérapie **4**, 182 (1949). — [38] Lecoq, R., u. P. Foquet: Ann. méd. psychol. **108**, 88 (1950). — [39] Lemieux, L. H.: Laval-Méd. **14**, 1304 (1949). — [40] Lubin, M., u. W. W. Westerfeld: J. of Biol. Chem. **161**, 503 (1945). — [41] Martensen-Larsen, O.: J. Amer. med. Assoc. **139**, 918 (1949). — [42] Moench, G. L.: N. York State J. of Med. **50**, 308 (1950). — [43] Pittré, D.: Farmaco (Pavia) **4**, 582 (1949). — [44] Raby, K., u. E. Lauritzen: Nordisk Med. **42**, 1693 (1949). — [45] Raby, K.: Nordisk Med. **42**, 1691 (1949). — [46] Requet, A., u. L. Revol: Presse méd. **57**, 966 (1949). — [47] Stotz, E.: J. of biol. Chem. **148**, 585 (1943).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 67—73 (1951).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Professor Dr. R. Schoen).

Versuche zur Regulation des onkotischen Drucks.

Von
Heinz Görtz und Fritz Hartmann.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. April 1951.)

Der osmotische Druck des Blutes ist eine komplexe Größe. Außer durch die beiden tragenden Komponenten des elektrolytosmotischen und kolloidosmotischen Drucks (KOD) wird das aktuelle Wasserverbindungsvermögen noch von den durch das Donnangleichgewicht charakterisierten Vorgängen an den biologischen Membranen sowie durch das Verhältnis zum örtlichen Blutdruck bestimmt. Im biologischen Geschehen bilden die verschiedenen Faktoren eine Wirkungseinheit und lassen sich nur künstlich voneinander getrennt fassen. Besonderes Interesse ist in jüngster Zeit der Regulation des elektrolytosmotischen Druckes (Verney[1]) und des Donnangleichgewichts (Hepp[2], Heinz und Netter[3]) zugewandt worden.

Verney konnte 1948 nachweisen, daß am Hund die Regulation des kristalloidosmotischen Drucks über Osmorezeptoren im Gebiet der Arteria carotis interna geschieht. Die Regulation wird wirksam über die Ausschüttung des Hypophysen-Hinterlappenhormons. Die osmotische Reizschwelle des Systems beträgt 1304 mm H_2O. Das entspricht einer Kochsalzlösung von 8 mg%. Dieser Schwellenwert ist einer antidiuretischen Wirkung von 0,000001 Einheiten Hypophysen-Hinterlappenhormon äquivalent.

Hepp, sowie Heinz und Netter konnten eine an die Erythrozyten gebundene Regulation des osmotischen Drucks nachweisen, die der Senkung des KOD bei wachsender CO_2-Spannung entgegenwirkt. Dies geschieht durch einen Wassereinstrom in die Erythrozyten als Folge einer Bikarbonatbildung in denselben. Die Plasmaeiweißkonzentration erhöht sich dadurch. Die durch die CO_2-Einwirkung entstandene Senkung des KOD wird so kompensiert.

Aus diesen Untersuchungen über die offenbar sehr feine Regulation einzelner an dem Wasserbindungsvermögen des Blutes beteiligten Vorgänge ergab sich die Frage nach dem Mechanismus der Regulation des KOD. Gegenüber dem elektrolytosmotischen Druck spielt der kolloidosmotische oder onkotische Druck eine untergeordnete Rolle. Er beträgt nur 0,5% der gesamtosmotischen Valenz des Blutes. Um so wichtiger ist seine Funktion an den biologischen Membranen, da diese für die Kolloide nicht durchgängig sind. Die Aufrechterhaltung des Plasmavolumens und des Flüssigkeitsgleichgewichtes zwischen Blut und

Gewebe ist Aufgabe der Plasmakolloide, vor allem des Albumins, von dem 1 g 18 g Wasser zu binden vermag.

Die vorliegenden Untersuchungen sollten zunächst nachweisen, daß auch der KOD eine biologisch regulierte Größe ist und Anhaltspunkte für Ort und Art einer solchen Regulation geben. Der Anlage solcher Versuche lag folgende Überlegung zugrunde: Der nach Verney für die Osmoregulation bestehende Mechanismus kommt aus zwei Gründen für die Onkoregulation nicht in Betracht. 1. Gelang es ihm nicht, mit verschieden hoch konzentrierten Kolloidlösungen die Regulation im Gebiet der Arteria carotis interna nachzuweisen. 2. Liegen aber die möglichen physiologischen und pathologischen Schwankungen des onkotischen Drucks weit unterhalb der Reizschwelle für das osmoregulatorische System; denn der Kolloiddruck des Blutes beträgt etwa 400 mm H_2O mit krankhaften Schwankungen von etwa 100—600 mm H_2O. Die Reizschwelle für das Ansprechen des Osmorezeptoren-Hypophysenhinterlappensystems beträgt aber 1304 mm H_2O. Fällt dieses System somit für die Onkoregulation aus, so liegt die Beteiligung der Leber an der Aufrechterhaltung des KOD um so näher. Denn außer durch Wasserein- oder -abstrom, wie es bei der elektrolytosmotischen Isotonie geschieht, kann der KOD auch durch Albuminabgabe in das Plasma oder Entnahme aus dem Plasma konstant gehalten werden. Daß die Leber der alleinige Bildner der Albumine ist, ist heute unbestritten. Ob sie jedoch ein wesentlicher Albuminspeicher ist, erscheint fraglich. Dagegen wird behauptet, daß sie bei Wasserbelastung Flüssigkeit vorübergehend zu speichern vermag (Bayliss und Starling[4], Adlersberg[5], Pick und Wagner[6], Kunz und Molitor[7]).

Versuchsanordnung.

1. Zum Nachweis einer Regulation des KOD beim Menschen wurden nach Feststellung der normalen Werte der physiologischen Schwankung folgende Untersuchungen gemacht:

a) Tagesrhythmuskurven des KOD und der Serumeiweißwerte.

b) Verlauf des KOD und der Serumeiweißfraktionen nach Blut- und Albumintransfusionen, sowie nach Aderlässen.

2. Die Rolle der Leber für die Aufrechterhaltung des KOD wurde am Hund und Menschen untersucht.

a) Bei 9 Hunden wurde in Pernoktonnarkose eine Kanüle in die Pfortader, eine zweite in die Lebervene eingeführt. Dann wurden in die Pfortader Infusionen von physiologischer Kochsalzlösung, 10% iger Albuminlösung oder 8% iger Globulinlösung gemacht. Gleichzeitig wurde in Minutenabständen bis zu einer Gesamtdauer von 45 min aus der Lebervene Blut entnommen und im Onkometer nach Hepp sowie im Mikroelektrophoreseapparat nach Antweiler[8] untersucht. Der Gesamteiweißwert wurde refraktrometrisch bestimmt.

b) An 4 Gesunden und 4 Kranken mit Leberzirrhosen wurde der Verlauf des KOD nach peroraler Belastung mit 1500 cm^3 Flüssigkeit geprüft.

Ergebnisse.

1. Die physiologische Schwankungsbreite des KOD ist sehr groß. Aus 100 Untersuchungen an gesunden Erwachsenen von 18—30 Jahren errechneten wir einen Mittelwert von N = 409 mm H_2O mit einer Dispersion von m = ± 50,16 mm H_2O bei einem mittleren Fehler des

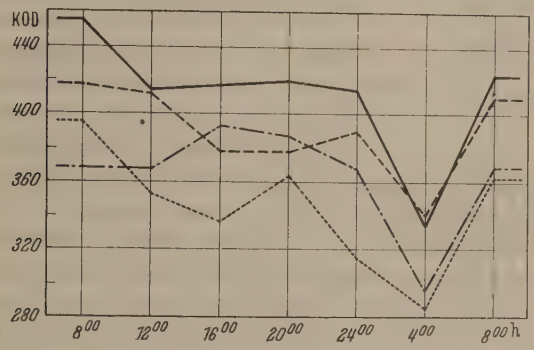


Abb. 1. Tagesrhythmische Schwankungen bei 4 gesunden Versuchspersonen.

Mittelwertes von M = 4,99 mm H_2O. Der höchste Wert war 509 mm H_2O, der niedrigste 288 mm H_2O.

a) An 4 gesunden Versuchspersonen wurde der KOD über 24 Std 4stündlich verfolgt. Das Ergebnis zeigt Abb. 1. Man erkennt 2 Gipfel, der erste liegt in den Morgenstunden, der zweite am späten Nachmittag.

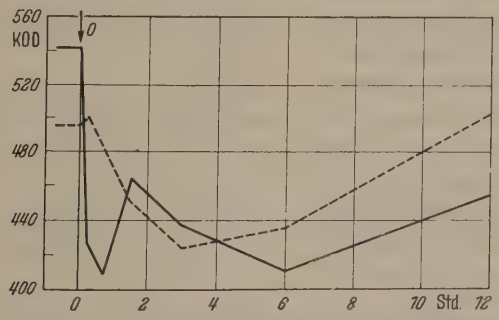


Abb. 2. Verhalten des onkotischen Druckes nach Aderlaß von 450 cm³ an 2 gesunden Versuchspersonen.

Ein sehr ausgeprägtes Minimum findet sich morgens gegen 4 Uhr. Das entspricht auch den rhythmischen Schwankungen der Serumalbumine, die von Hartmann und Schumacher[9] nachgewiesen wurden.

b) Nach Aderlässen kommt es zu einer erheblichen Senkung des KOD, die, wie die Beispiele der Abb. 2 zeigen, träge reguliert wird (Abb. 2).

c) Das Verhalten des KOD nach *Blut-* und Albumintransfusionen ist unterschiedlich. Normalerweise kommt es zu einem Anstieg des KOD, der aber nach 5—6 Std wieder reguliert ist (Abb. 3). Dagegen muß man auch mit vorübergehenden Senkungen des KOD rechnen, die aber meist schnell wieder ausgeglichen werden.

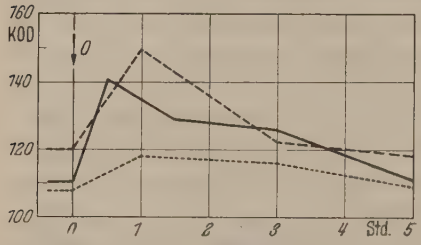


Abb. 3. Verlauf des KOD nach Transfusion von 100 cm³ einer 10%igen Albuminlösung (———) und nach Transfusion von 350 cm³ Blut (------; ·····).

d) Auf die Bedeutung der Leber für die Onkoregulation des Menschen weisen die Ergebnisse der Flüssigkeitsbelastung hin (Abb. 4). Beim Gesunden kommt es nach Aufnahme von 1500 cm³ Flüssigkeit meist zu einer Senkung des KOD, die nach 3 Std ausgeglichen ist. Dann übersteigt der KOD offenbar im Rahmen einer Überkompensation den Ausgangswert. Es kommt auch vor, daß der KOD gleich nach der H_2O-Belastung ansteigt. Bei schweren Leberschäden dagegen kommt es zu einer wesentlich stärkeren Senkung des KOD, die sehr langsam ausgeglichen wird.

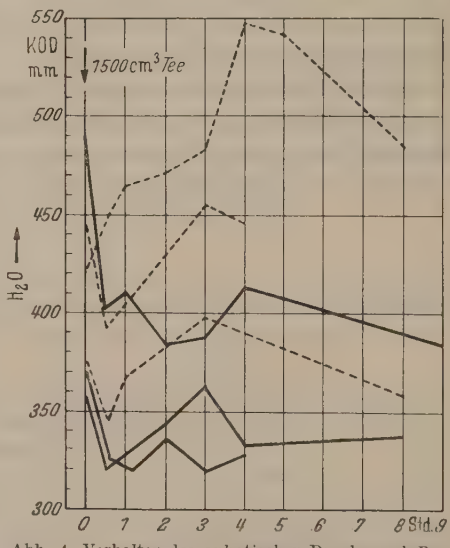


Abb. 4. Verhalten des onkotischen Drucks nach Belastung mit 1500 cm³ Tee bei Gesunden (- - -) und Leberzirrhotikern (—).

2. Das Ergebnis der Hundeversuche war übereinstimmend. Das Verhalten von KOD und Gesamteiweiß im Lebervenenblut nach Infusion von 0,9%iger NaCl bzw. 10%iger Albuminlösung in die Pfortader geht aus den Abb. 5 und 6 hervor. Die infundierte Flüssigkeit führt gleich zu einer Senkung des KOD im Lebervenenblut. Offenbar wird die Flüssigkeit nicht in der Leber festgehalten, um dann langsam abgegeben zu werden. Sie wird auch nicht mit Albumin aufgefüllt, so daß die Konstanz des KOD im Lebervenenblut gewährleistet wäre. Andererseits zeigen die Infusionsversuche mit Albumin- und Globulinlösungen, daß auch die Eiweißkörper sofort die Leber passieren und gleich, wie sich elektrophoretisch nachweisen ließ, im Lebervenenblut erscheinen. Sie werden also nicht primär gespeichert und dann langsam abgegeben (Abb. 5 u. 6).

Besprechung der Ergebnisse.

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen kann kein Zweifel darüber bestehen, daß der KOD des Blutes ebenso wie der elektrolytosmotische Druck eine regulierte Größe ist.

Vergleichende Untersuchungen des KOD und der Serumeiweißfraktionen beweisen, daß seine Regulation vor allem an die Serum-

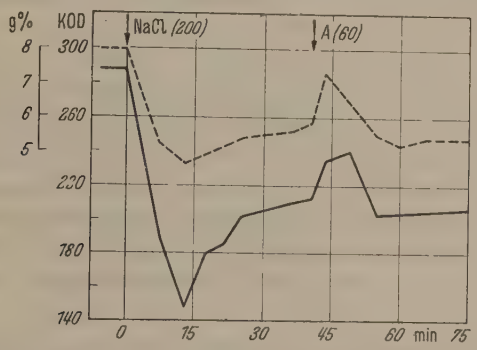


Abb. 5. Verlauf von Gesamteiweiß und KOD nach Infusion in die Pfortader von 200 cm³ 0,9%iger Kochsalzlösung und später 60 cm³ 10%iger Albuminlösung im Lebervenenblut.

Albuminfraktion geknüpft ist. Sowohl im tagesrhythmischen Verlauf wie nach Aderlässen, sowie Blut- und Albumininfusionen zeigt sich die

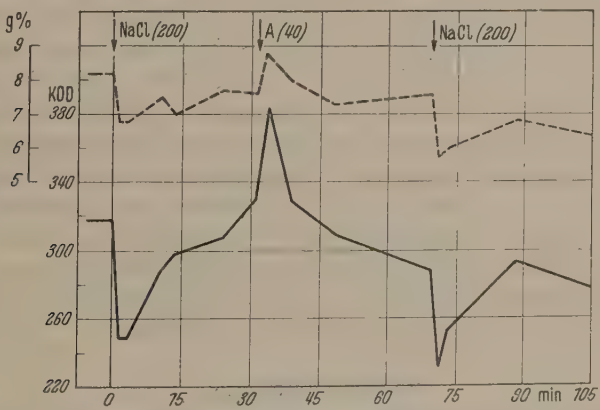


Abb. 6. Wirkung von Kochsalz- bzw. Albumininfusionen in die Pfortader auf Gesamteiweiß und KOD Lebervenenblut.

Abhängigkeit des KOD von der Albuminfraktion. Der gesunde Organismus ist bestrebt, über eine Konstanthaltung der Albuminfraktion auch das Niveau des KOD auf gleicher Höhe zu halten. Das geschieht, wie Janeway und Mitarbeiter[9] gezeigt haben, nach einer Albumininfusion zunächst durch Wassereinstrom in die Blutbahn. Das Plasmavolumen steigt, fällt aber im Laufe von 6 Std wieder zum Ausgangswert ab.

Man muß damit rechnen, daß in dieser Zeit auch die therapeutische Wirkung einer z. B. wegen eines protoplasmatischen Schocks durchgeführten Bluttransfusion oder Albumininfusion wirkungslos geworden ist und unter Umständen wiederholt werden muß. In dieser Zeit muß das Albumin die Blutbahn verlassen haben, ohne daß bisher bekannt ist wohin es geht und wie dieser Abstrom reguliert wird. Wegen der zentralen Stellung der Leber im Albuminhaushalt lag es nahe, in diesem Organ auch den Ort der Regulation zu suchen. Das schien um so mehr gerechtfertigt, als bei Leberkrankheiten offenbar eine Fehlregulation vorkommt. Diese äußert sich in tiefliegenden onkotischen Drucken und in starken Senkungen sowie langsamer Einregulierung derselben nach Flüssigkeitsbelastung. Jedoch weisen Beobachtungen beim Transfusionsschock auf die Möglichkeit einer allgemeineren Störung hin. Es ist nicht anzunehmen, daß das plötzliche Verschwinden der Albumine und die rapide Senkung des KOD bei Schocks oder Schüttelfrösten, die nach Blut- oder Albumintransfusionen vorkommen, nur durch eine Fehlsteuerung der Leberfunktionen zustande kommen.

Die Tierversuche konnten auch keine Klärung der Frage bringen, welche Rolle die Leber in der Onkoregulation spielt. Sicher ist im Gebiet der Pfortader kein selbständiges regulatorisches Prinzip zu suchen. Onkotische Reize, die in der Pfortader durch Infusion von Kochsalz- oder hochkonzentrierten Albuminlösungen gesetzt werden, lösen keine Regulation durch die Leber aus, etwa in dem Sinne, daß durch vorläufige Retention der Flüssigkeit oder des Eiweißes, oder Abgabe von Albumin zur infundierten Flüssigkeit oder Wasser zum infundierten Albumin der KOD in dem die Leber verlassenden Blut konstant gehalten würde. Vielmehr passieren die in die Pfortader infundierten Lösungen die Leber unverändert, wie sich vor allem elektrophoretisch für Albumin und Globulin nachweisen ließ. Wenn trotzdem nach einiger Zeit der Ausgangs-KOD im Gesamtblut wieder hergestellt ist, so muß daraus geschlossen werden, daß Flüssigkeit bzw. Albumin in anderen Gebieten die Blutbahn verlassen haben, daß der Ort dieses Regulationsmechanismus anderswo als in der Leber gesucht werden muß.

Zusammenfassung.

1. An 100 Versuchspersonen wird der Mittelwert des normalen KOD mit 409 mm H_2O bestimmt. Die physiologische Schwankung beträgt $\pm$ 50,16 mm H_2O.

2. Auf eine Regulation des kolloidosmotischen Drucks weist die Existenz tagesrhythmischer Schwankungen hin, die mit den Schwankungen des Serumalbumins parallel gehen. Nach Aderlässen sowie Blut- und Albumininfusionen wird die entstandene Erniedrigung bzw. Erhöhung des KOD innerhalb von 4—6 Std ausgeglichen.

3. Auf die Rolle der Leber für die Regulation des KOD weist der Befund hin, daß es nach Flüssigkeitsbelastungen bei Leberkranken zu einer starken Senkung des KOD kommt, die im Gegensatz zum Gesunden sehr langsam ausgeglichen wird.

4. Ein primär onkoregulatorisches Prinzip der Leber konnte im Hundeversuch nicht nachgewiesen werden. In die Pfortader infundierte Kochsalz- bzw. Albuminlösungen passieren die Leber unverändert.

Literatur.

[1] Verney: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 387 (1948). — [2] Hepp: Z. Biol. **99**, 230 (1938). — [3] Heinz u. Netter: Klin. Wschr. **24/25**, 491 (1947). — [4] Starling: The Fluids of the body. London 1909. — [5] Adlersberg: Klin. Wschr. **1**, 393 (1934). — [6] Pick u. Wagner: Wien. med. Wschr. **1**, 695 (1923). — [7] Kunz u. Molitor: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **121**, 342 (1927). — [8] Hartmann u. Schuhmacher: Z. Naturforschg **54**, 361 (1950). — [9] Janeway u. Mitarbeiter: J. clin. Invest. **23**, 465 (1944).

Doz. Dr. F. Hartmann, Göttingen, Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 74—82 (1951).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. Matthes).

Zur Pharmakodynamik des cholinergischen Wirkbildes am menschlichen Dünndarm.

Von
Hans-Jürgen Sielaff.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. Mai 1951.)

Seitdem Le Heux im Jahre 1919 das *Cholin* als darmeigene biologisch wirksame Substanz nachwies, sind über diesen Stoff und seine Derivate mehrfach Untersuchungen mit teilweise widersprechenden Ergebnissen angestellt worden. Meist wurden letztere an Tierexperimenten gewonnen, während über die Pharmakodynamik des menschlichen Dünndarms nur spärliche Mitteilungen vorliegen.

Bei Durchsicht des Schrifttums ist unseres Erachtens eine grundsätzliche Einteilung der Versuchsbedingungen bezüglich Testobjekt und Methodik erforderlich, um eindeutige Beurteilungen der Ergebnisse zu ermöglichen. 3 Gruppen stellen sich heraus: 1. Versuche am isolierten — den Einflüssen des vegetativen Nervensystems entzogenen Tierdarm. 2. Versuche am intakten Tierdarm (in situ). 3. Versuche am intakten menschlichen Darm. Während im Tierversuch die Darmmotilität meist graphisch registriert wird (am isolierten Darm z. B. nach dem Verfahren von Magnus), ist die Röntgenuntersuchung für den intakten — insbesondere menschlichen Dünndarm die Methode der Wahl geworden. Die Analyse der feineren Bewegungsvorgänge hat vor allem mit Hilfe der Kymographie weitgehende Vervollkommnung gefunden. So wurde die graphische Registriermethode beim Menschen — von Ganter grundlegend entwickelt und auch von Weitz und Vollers angewandt — zunächst kaum berücksichtigt. Erst die Verwendung der doppellumigen Dünndarmsonde durch Abbott und Miller brachte einen weiteren Ausbau der graphischen Motilitätsstudien am menschlichen Dünndarm mit sich. Im amerikanischen Schrifttum sind hierüber inzwischen beachtliche Mitteilungen erschienen (Abbott, Miller, Pendergrass, Elsom und Drossner, Ingelfinger u. a.).

Bei gedrängter Betrachtung der wesentlichsten Untersuchungsergebnisse zeigt sich, daß auf den isolierten bzw. vom Nervensystem völlig getrennten Tierdarm durch Cholin grundsätzlich ein *erregender*, positiv ino- und tonotroper Effekt ausgeübt wird (Akahosi, Le Heux, Kratinoff und Novikova, Magnus, Never und Vincke u. a.). Infolge der überragenden Bedeutung des autonomen Nerven-

systems sind aber Versuche am intakten Tierdarm aufschlußreicher. Hier fanden zwar Le Heux und Magnus ebenfalls einen aktivierenden Cholineinfluß mit Steigerung der Transportwirkung, Kühlewein Erregung des durch Chloroform vorher gelähmten Katzendarmes. Von den übrigen Autoren wurde jedoch — vorwiegend am Hunde- und Katzendarm — meist ein *wechselnder*, teils erregender, teils hemmender Cholineffekt registriert (Akahosi, Babsky und Eidinowa, Carlson, Smith und Gibbins, Kratinoff und Novikova, Mulinos). So wurden auch negativ ino- und tonotrope Phasen beobachtet, die Akahosi auffallenderweise nach Nebennierenexstirpation nicht mehr feststellen konnte. Mulinos sah unter praktisch physiologischen Bedingungen am Hundemagen ausschließlich hemmende Cholinwirkung; die übrigen Ergebnisse sind unseres Erachtens infolge weitestgehender Beeinflussung der neuralen Regulationsmechanismen durch Chloroform-Äther-Barbitursäurenarkose, Decerebrierung u. ä. meist nur bedingt verwertbar. Untersuchungen am menschlichen Darm dürften daher infolge optimaler physiologischer Bedingungen bedeutungsvoll sein.

Klee und Grossmann sowie Wolf und Canney sahen an Pat. mit postoperativer bzw. peritonealer Darmlähmung nach Cholininfusionen gesteigerte Darmmotilität, Spatz und Wiechmann bei Röntgenstudien auch hemmende Einflüsse des Cholins. Herforth fand mit der Ballonmethode nach Weitz und Vollers am menschlichen Magen gelegentliche Tonusverminderung, im ganzen aber keine wesentliche Cholinwirkung bezüglich Tonus und Motilität. Weitere einschlägige Untersuchungen am Menschen sind uns bisher nicht bekannt geworden.

Eigene Untersuchungen.

An 40 stationären Patienten mit vorwiegend gastro-intestinalen Erkrankungen (Gastritis, Ulcus ventriculi und duodeni, Narbenbulbus, akute und chronische Hepato- und Cholecystopathien) wurde das Verhalten des Dünndarms auf Zufuhr von cholinergischen Substanzen geprüft. Die Magensäurewerte waren in 20 Fällen hyperazid, 10mal normazid, bei den restlichen 10 Patienten fand sich eine Sub- bzw. Anazidität, eingeschlossen 3 Fälle von histaminrefraktärer Achylie. 7 Kranke mit vorwiegend hyperaziden Werten boten klinisch das Bild ausgeprägter vegetativer Labilität.

Methodik.

Zur Anwendung gelangte sowohl die graphische Registrierung als auch die Röntgenuntersuchung einschließlich der Kymographie.

Die etwa 3 m lange doppellumige Dünndarmsonde nach Müller-Abbott wurde den nüchternen Vp. nach Anästhesie des Nasen-Rachenraumes pernasal eingeführt und nach Gewinnung von Galle die Lage der Sondenspitze röntgenologisch kontrolliert. War letztere im absteigenden Duodenalast, so wurde der am distalen Sondenende befindliche Gummiballon mit durchschnittlich 35—40 cm^3 Luft gebläht, nachdem das entsprechende orale Lumenende mit einem weiteren Schlauchsystem verbunden war. Die Darmmotilität wurde so vermittels Luftübertransmission über eine Marey-Kapsel auf einem langsam laufenden Rußkymographion registriert. Die Förderwirkung des Ballons stellten wir am Wandern der Sondenmarkierungen, nach Versuchsende auch röntgenologisch fest. Das 2. Sondenlumen ermöglichte Absaugung von Darmsekret bzw. Zufuhr einer zu prüfenden Substanz. Registriert wurden die oberen Dünndarmabschnitte (Duodenum und Jejunum), in 2 Fällen zusätzlich das Ileum.

Auf diese Weise erhielten wir charakteristische Motilitätskurven, die früher von Ganter, Weitz und Vollers und in neuerer Zeit von den genannten amerikanischen Autoren beschrieben wurden. Das *Grundbild der Motilität* wurde von meist regelmäßigen, durchschnittlich 10 bis 12 mal in der Minute auftretenden kleinen Wellen beherrscht, die bei gleichzeitiger Röntgendurchleuchtung typischen Pendelbewegungen des Sondenballons entsprachen und von Ingelfinger „S (small) Waves"

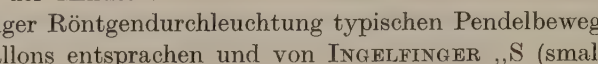


Abb. 1. Ruhiges Motilitätsbild.

genannt wurden. Seltener und meist unregelmäßiger fanden sich — vom gleichen Autor als „L (large) Waves" bezeichnete — verhältnismäßig große und länger anhaltende Wellen, die zum Teil von Pendelbewegungen überlagert wurden und wohl peristaltischen Tonusschwankungen entsprechen. Der „Motilitätstyp" war im übrigen individuell unterschiedlich: In der Mehrzahl der Fälle herrschte ein vorwiegend regelmäßiges und geordnetes Bewegungsbild vor (Abb. 1), seltener fanden sich — in der Hauptsache bei Patienten mit stärkerer vegetativer

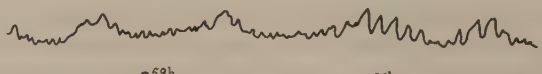


Abb. 2. Unruhiges Motilitätsbild mit stärkeren Tonusschwankungen und Hypermotilität.

Labilität — unruhigere Bilder mit ausgeprägteren Tonusschwankungen und Hypermotilität (Abb. 2).

Zwecks Kontrolle unserer Ergebnisse führten wir in einer Anzahl von Fällen Röntgenuntersuchungen durch und ergänzten die graphischen Befunde durch Übersichts- und Zielaufnahmen bzw. Kymogramme des kontrastgefüllten Dünndarms.

Zur Prüfung gelangte hauptsächlich Cholin (als Cholin. chloratum Merck), ferner Azetylcholin, Doryl und Prostigmin. Die Zufuhr erfolgte intravenös, beim Cholin auch transduodenal bzw. jejunal.

Ergebnisse.

Von *Cholin.* chlor. wurden insgesamt 103 intravenöse Injektionen zwischen 0,1 und 0,8 g, in einigen Fällen auch Infusionen mit 1,0 bzw. 2,0 g durchgeführt. Meist injizierten wir 0,3 g durchschnittlich innerhalb 1 min (38 mal) bzw. 0,5 g bei 1,5—2 min. Injektionsdauer (30 mal). Bei diesem Vorgehen wurden die Patienten durch die bekannten Cholin-Allgemeinwirkungen subjektiv nicht allzu stark beeinflußt.

Die Reaktion des Dünndarms war in überwiegendem Maße konstant: meist erfolgte während oder kurz nach der Injektion — mitunter

nach flüchtigem Tonusanstieg — ein eindeutiger negativ tono- und inotroper Effekt, gekennzeichnet durch Absinken des Tonus und weitgehende Verkleinerung bzw. Einbuße der Kontraktionswellen. Die Dauer dieser *Hemmungsphase* stand offensichtlich in enger Beziehung zur jeweiligen Dosis und betrug beispielsweise bei 0,3 g durchschnittlich

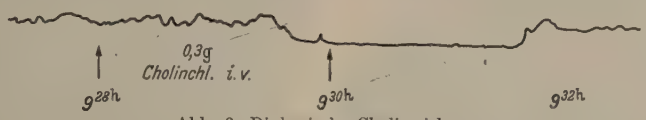


Abb. 3. Diphasische Cholinwirkung.

1—3 min, bei 0,5 g 3—5 min. Danach war grundsätzlich ein reaktiver Tonusanstieg mit Wiederkehr der regulären Motilität zu verzeichnen, die Cholinwirkung somit offenbar abgeklungen. Ein Beispiel dieses diphasischen Reaktionsablaufes ist in Abb. 3 wiedergegeben.

In Übereinstimmung mit den graphisch gewonnenen Befunden beobachteten wir die gleichen Reaktionen auch röntgenologisch: Abb. 4 läßt deutlich den negativ tonotropen, Abb. 5 bei einem anderen Patienten den negativ inotropen Cholineffekt im oberen Jejunum erkennen.

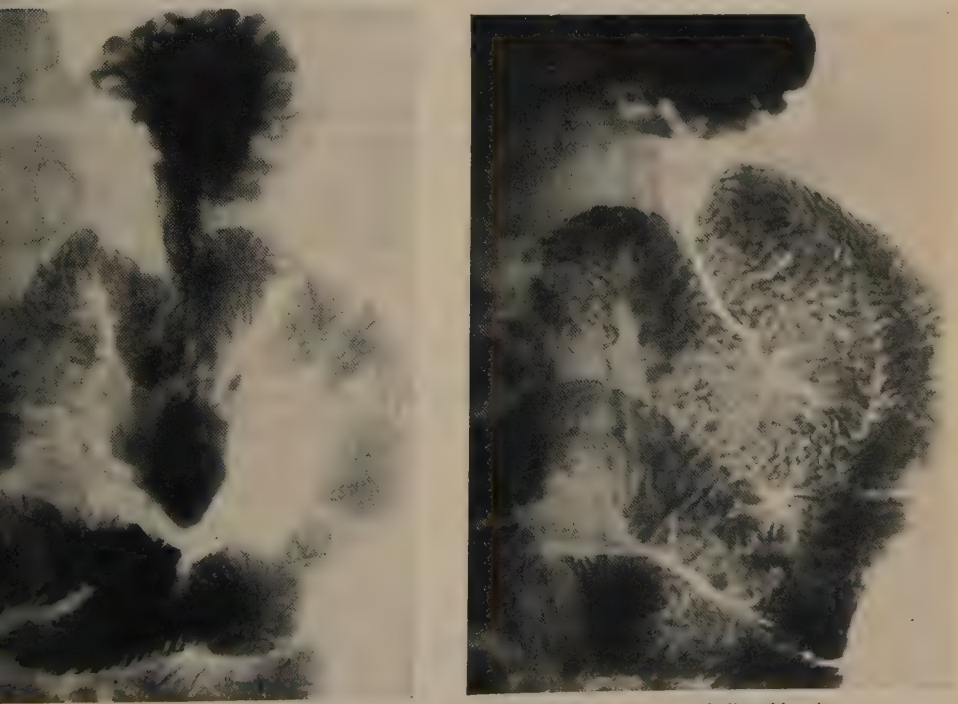


Abb. 4. a) Oberes Jejunum vor Cholininjektion. b) Nach Injektion von 1,0 g Cholin. chlor. i.v.: deutlicher Tonusverlust.

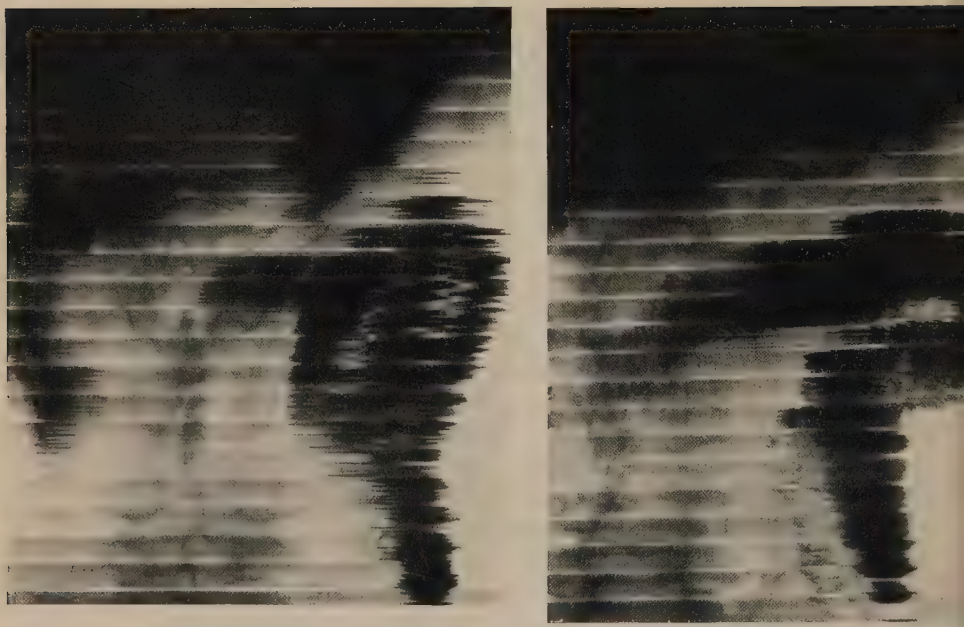


Abb. 5. a) Kymogramm des oberen Jejunums vor Cholininfus. (Rasterlauf 15 sec). b) Nach Infusion von 2,0 g Cholin. chlor.: deutliche Verkleinerung der Randzacken.

In wenigen Fällen (4) sahen wir ausgeprägtere polyphasische Wirkbilder mit lebhaftem Tonus- und Motilitätswechsel, auffallenderweise bei Patienten mit klinischen Zeichen vegetativer Labilität (Abb. 6).

Abb. 6. Polyphasische Cholinwirkung.

Wir haben ferner den Eindruck gewonnen, daß die Hemmungsphase bei Patienten mit Anazidität bzw. histaminrefraktärer Achylie besonders

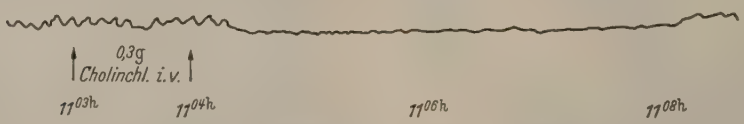


Abb. 7. Lange Hemmungsphase bei histaminrefraktärer Achylie.

lang anhalten kann (Abb. 7); hierüber muß jedoch erst größeres Zahlenmaterial weiteren Aufschluß geben.

Auf dem Blutwege zugeführtes Cholin ruft demnach am menschlichen Dünndarm ein wechselndes Wirkbild mit cholin- und adren-

ergischen Phasen hervor, in welchen die übergeordneten vegetativen Regulationen zweifellos ausschlaggebend zur Geltung kommen. Wahrscheinlich bilden die jeweiligen Reaktionstypen bzw. die unterschiedliche Dauer der adrenergischen Hemmungsphase ein Äquivalent zur entsprechenden vegetativen Ausgangslage mit jeweils individuell erhöhter cholin- bzw. adrenergischer Reaktionsbereitschaft. Empirische

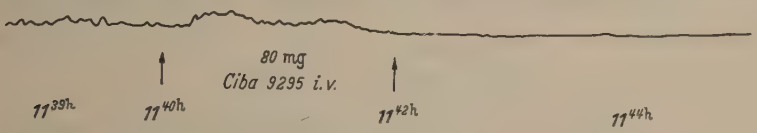


Abb. 8. Tonus- und Motilitätsverlust nach „Ciba 9295".

Bestätigung vorausgesetzt, wäre damit ein Hilfsmittel für die vegetative Regulationsdiagnostik gegeben.

Auf der Suche, die übergeordneten autonomen Einflüsse beim Cholineffekt zu unterbinden, erprobten wir das Präparat „Ciba 9295"*. Dieser „*ganglionic-blocker*" soll eine Hemmung der synaptischen Übertragung in den Ganglien der autonomen Nervenfasern beider Systeme bewirken. Bein und Meier konnten auch im Tierversuch nach Zufuhr dieser Substanz langanhaltende Hemmung des elektrischen Vagusreizes bzw. des Nikotineffektes nachweisen, während Azetylcholin infolge rein peripherer Einwirkung auf das Erfolgsorgan weiterhin wirksam war. Eigene Versuche an 12 Patienten erbrachten sowohl graphisch als auch röntgenologisch unter intravenöser Injektion von durchschnittlich 60 bzw. 80 mg „Ciba 9295" konstant einen fast schlagartigen und langanhaltenden Tonusabfall und Motilitätsverlust des Dünndarms (Abb. 8).

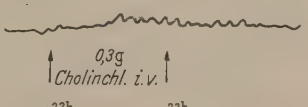


Abb. 9.
Monophasische Cholinwirkung nach vorheriger Injektion von „Ciba 9295".

Schlossen wir nun eine intravenöse Injektion von 0,3 bzw. 0,5 g Cholin. chlor. an, so erfolgte diesmal eine teilweise zwar geringe und verhältnismäßig kurzfristige, aber doch deutlich *monophasische* positiv ino- und tonotrope Wirkung (Abb. 9).

Hierdurch dürfte erwiesen sein, daß dem Cholin bei Zufuhr auf dem Blutwege seine ursprünglich peripher-aktivierende Wirkung auf Tonus und Motilität des Dünndarms erst nach Ausschaltung übergeordneter Regulationen zugesprochen werden darf.

Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß wir nach transduodenaler bzw. jejunaler Cholinzufuhr von 0,5—4,0 g durch das 2. Sondenlumen bei 10 Patienten in den meisten Fällen prompte Tonus-

* N, N, N′, N′-3-Pentamethyl-N, N′-diäthyl-3-aza-pentylen-(1,5)-diammoniumdibromid („Pendiomid").

und Motilitätssteigerung mit größeren Wellenbewegungen und länger anhaltenden Kontraktionen bei gesteigertem Sondentransporteffekt beobachten konnten (Abb. 10).

Offenbar kommt bei primär lokalem Angriffspunkt, unter Umgehung des Blutweges, die periphere Cholinwirkung zur Geltung; es bleibt

Abb. 10. Transduodenale Cholinwirkung.

weiteren Untersuchungen vorbehalten, inwieweit hierbei übergeordnete Regulationen eingreifen können.

In kleinerem Umfange wurden vergleichende Untersuchungen über Azetylcholin, Doryl und Prostigmin angestellt.

Von *Azetylcholin* wurden 15 Pat. 30 i.v. Injektionen von 0,01—0,1 g, meist 0,05 bzw. 0,1 g innerhalb ½—1 min gegeben. Nur in 3 Fällen von Anazidität erfolgte schon bei kleinen Dosen (0,03 bzw. 0,05 g) eine flüchtige Tonus- und Motilitätssteigerung, bei den übrigen 12 Vp. — darunter 9 hyperaziden — war praktisch keine Wirkung zu ersehen.

Nach v. Hueber ist die Serum-Esterase, deren rasch hemmende bzw. zerstörende Wirkung auf das A.Ch. wohl die „Versager" erklärt, quantitativ vom „Vagusstoff" abhängig und z. B. bei vagotonischen Krankheitsbildern erhöht. Weitere Untersuchungen sollen daher dieser Frage näher nachgehen und u. a. die Beziehungen zwischen Aziditätsverhältnissen und Azetylcholineffekt herausstellen, desgleichen den Einfluß von Esterase-Inhibitoren.

8 i.v. Injektionen von Doryl (0,125 mg und weniger) riefen bei 4 Pat. nur teilweise geringfügige positiv-inotrope Effekte hervor; eingehendere Erfahrungen hierüber sind erforderlich.

Prostigmin, welches in den unteren Dünndarmabschnitten seine stärkste Wirkung ausüben soll, erprobten wir an 12 Patienten (0,5 mg in-

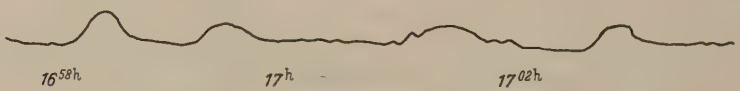


Abb. 11. Prostigminwirkung auf das Ileum.

travenös) und fanden in der Tat besonders im Ileum ausgeprägte, rhythmisch wiederkehrende große Rollbewegungen mit sichtlichem Transporteffekt der Sonde (Abb. 11).

Die Wirkung auf das Jejunum der übrigen 11 Versuchspersonen war verhältnismäßig geringer, zum Teil sogar nur angedeutet.

Zwischen Injektion und Wirkung bestand im übrigen durchschnittlich eine Latenzzeit von 4—6 min; diese dürfte — der pharmakologischen Eigenart des Prostigmins entsprechend — zur Hemmung der Esterase notwendig sein. „Ciba 9295" hob in 3 Fällen — vor bzw. nach Injektion von Prostigmin gegeben — dessen Wirkung auf.

Unsere bisherigen Untersuchungen ergeben somit, daß das Prostigmin als Aktivator von Tonus und Motilität den übrigen auf dem Blutwege zugeführten cholinergischen Substanzen überlegen sein dürfte. Diese Erfahrungen wurden in jüngster Zeit auch von NAUMANN röntgenologisch gewonnen.

Abschließend möchten wir zum Ausdruck bringen, daß unseres Erachtens pharmakodynamische Untersuchungen am menschlichen Dünndarm bei Berücksichtigung der weitverzweigten und differenzierten neurovegetativen und humoralen Regulationen des menschlichen Organismus den Tierexperimenten vorzuziehen sind. Dabei sind wir wie FÓTI der Ansicht, daß durch Kombination der graphischen Registriermethode mit der Röntgenologie ein wesentlicher Ausbau der funktionellen Dünndarmdiagnostik und damit weitere Kenntnisse der neurovegetativen Regulationen zu erwarten sind.

Zusammenfassung.

1. Auf dem Blutwege zugeführtes Cholin ruft am menschlichen Dünndarm ein di- oder polyphasisches cholin-adrenergisches Wirkbild hervor, in welchem die adrenergische Hemmungsphase ausschlaggebend zur Geltung kommt. Erst nach Unterbindung übergeordneter autonomer Regulationen durch „ganglionic-blocker" („Ciba 9295") darf dem Cholin seine monophasisch-cholinergische Wirkung zugesprochen werden, offenbar auch bei primär lokalem Angriffspunkt im Darm.

2. Vergleichende Untersuchungen mit intravenös zugeführtem Cholin, Azetylcholin und Doryl ergaben, daß dem Prostigmin die größte cholinergische Wirkung beizumessen ist. Die Wirkung des Prostigmins ist jedoch am oberen Dünndarm offenbar geringer als am Ileum. Der Azetylcholineffekt dürfte öfters durch die Serumesterase unterdrückt werden.

3. Durch Kombination der graphischen Registriermethode mit der Röntgenologie ist ein wesentlicher Ausbau der funktionellen Dünndarmdiagnostik zu erwarten.

Literatur.

ABBOTT, W. O., u. E. P. PENDERGRASS: Amer. J. Roentgenol. **35**, 289, 315. (1936). — AKAHOSI, K.: Nagas. Igak. Zas. **16**, 1677. — BABSKY, E., u. M. EIDINOWA: Pflügers Arch. **222**, 656 (1929). — BEIN, H. J., u. R. MEIER: Exper. VI, **9**, 351 (1950). — CARLSON, A. J., E. A. SMITH u. J. GIBBINS: Amer. J. Physiol. **81**, 431 (1927). — ELSOM, K. A., u. J. L. DROSSNER: Amer. J. dig. dis. VI, **9**, 589 (1939). — FÓTI, M.: Fortschr. Röntgenstr. **73**, 603 (1950). — GANTER, G.: Münch. med. Wschr. **68**, 1447 (1921). — Pflügers Arch. **201**, 101 (1923). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **103**, 84 (1924). — Münch. med. Wschr. **1924**, 194. — HERFORTH, T.: Z. exper. Med. **76**, 463 (1931). — LE HEUX, J. W.: Pflügers Arch. **173**, 8 (1919); **179**, 177 (1920); **190**, 4/6, 280, 301 (1921). — v. HUEBER, E. F.:

Dtsch. med. Wschr. **1942**, 483. — Ingelfinger, F. J., u. W. O. Abbott: Amer. J. dig. dis. VII, **11**, 468 (1940). — Klee, Ph., u. O. Grossmann: Münch. med. Wschr. **1925**, 251. — Kratinoff, A. G., u. M. A. Novikowa: Z. exper. Med. **65**, 427 (1929). — Kühlewein, M.: Pflügers Arch. **191**, 99 (1921). — Magnus, R.: Münch. med. Wschr. **1925**, 249. — Miller, T. G., u. W. O. Abbott: Amer. J. med. Sci. **187**, 595 (1934). — Miller, T. G., u. F. D. W. Lukens: Z. klin. Med. **145**, 219 (1949). — Mulinos, M. G.: Amer. J. Physiol. **77**, 158 (1926). — Naumann, W.: „Funktionelle Dünndarmdiagnostik im Röntgenbild." Stuttgart: Georg Thieme-Verlag 1948. — Never, H., u. E. Vincke: Z. exper. Med. **106**, 352 (1939). — Spatz, H., u. E. Wiechmann: Münch. med. Wschr. **1924**, 1425. — Weitz, W., u. W. Vollers: Z. exper. Med. **47**, 42 (1925). — Wolf, C. G. L., u. J. R. C. Canney: Lancet CCX, 707 (1926).

Dr. Hans-Jürgen Sielaff, Erlangen, Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 83—92 (1951).

Aus der I. Mediz. Universitäts-Klinik, Frankfurt a. M.
(Kom.-Leiter: Prof. Dr. W. H. Hauss).

Zur Reaktion der Eosinophilen im Tierversuch.

Von
W. H. Hauss, H. Kreuziger und L. Lammers.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Mai 1951.)

Änderungen der Gesamt-Leukozytenzahl im peripheren Blut sowie Verschiebungen des Differentialblutbildes durch verschiedenartige, unter anderem auch zentrale Reize (Heilmeyer[1], Hoff[2]) sind bekannt. Besonders markant erscheinen die Schwankungen der Eosinophilen (Eos), die seit den Arbeiten von Selye[3] erneut in den Blickpunkt des Interesses getreten sind. Thorn[4], Dougherty[5] sowie Herbert[6] haben auf den Zusammenhang zwischen der Funktionstüchtigkeit der Nebennierenrinde und der Zahl der Eos hingewiesen und den bekannten Test ausgearbeitet.

Nachdem wir (Hauss[7]) vor Jahren die Blutveränderungen (Leukozytenzahl, Blutzucker, Rest-N, BSG.), die wir nicht nur beim Herzinfarkt sondern auch bei anderen Formen des Kreislaufkollapses fanden, als humorales Kollapssyndrom bezeichnet hatten, konnten wir (Hauss[8]) auch eine Verminderung der eosinophilen Zellen nach Herzinfarkten nachweisen.

Die letzte Reaktion gab uns Veranlassung, das Verhalten der Eos und der Gesamtleukozyten unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu beobachten.

Methodik.

Die Zählung der Eos erfolgte nach der von Randolph[9] angegebenen Methode, die gegenüber der Dungerschen[10] erhebliche Vorteile bietet. Unter anderem ermöglicht sie die gleichzeitige Bestimmung von Gesamt-Leukozyten und Eos-Zahl. Die von uns mitgeteilten Werte sind jeweils Mittelwerte aus mindestens 5 voll ausgezählten Bürker-Kammern. Dabei machten wir die Erfahrung, daß die Eos sich besser anfärbten, wenn man die aufgezogene Pipette während der Färbezeit (30—45 min) bei + 30° C hält.

Unsere Versuche wurden an im Stoffwechselkäfig gehaltenen Hunden durchgeführt. Das Einbringen in den Käfig kann bereits ein Absinken der Eos zur Folge haben (vgl. Versuch: Tab. 3, 10/51, Tab. 4, 13/51).

Wird das Tier besonders gereizt, z. B. durch Konfrontierung mit einer Katze, so kann es zum völligen Verschwinden der Eos kommen (siehe

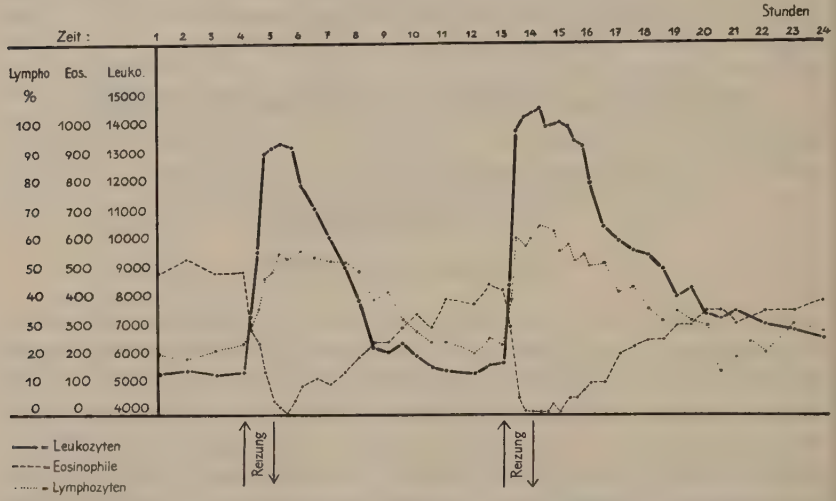


Abb. 1. Hund Bobby, 31/51, 17 kg, zeigt das Verhalten der Gesamtleukozyten und Eosinophilen, sowie der Lymphozyten während zweier Erregungszustände.

Tabelle 1. *Die Wirkung einer Äther-Narkose bei 4 Versuchstieren auf die Zahl der Gesamtleukozyten und Eosinophilen im peripheren Blut.*

Zeit:	1/51 Albert		2/51 Kai		3/51 Nora		4/51 Bella	
	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.
Vor Narkose:								
24 Std	7100	700	6400	600	7900	780	7300	530
18 Std	7000	670	6200	600	8500	750	7600	600
2 Std	7400	720	5800	650	8200	740	7400	450
1 Std	7100	670	6400	550	8600	740	7800	520
Nach Nark.:								
Sofort	7600	720	6200	590	8500	750	7200	500
1 Std	7300	660	6700	570	9200	680	6700	450
2 Std	7700	580	7100	630	10100	530	8500	510
3 Std	8400	500	7600	440	10900	410	8400	400
4 Std	9000	410	7600	410	10200	520	9900	390
5 Std	9200	480	8400	470	11100	510	10300	300
6 Std	9600	600	7300	520	10000	630	8300	270
7 Std	8100	620	7400	530	8700	620	7100	350
8 Std	8000	640	6500	610	8800	580	7200	400
9 Std	5050	570	6400	660	8400	640	7500	510
10 Std	8000	580	6700	620	7600	630	6700	450
11 Std	8500	620	6400	640	8400	690	7400	470
12 Std	8700	650	6300	620	8900	650	7700	560
24 Std	8000	610	7000	620	7700	700	7300	460
30 Sdt	8400	660	6700	680	8500	650	7400	450

Abb. 1). Um diese Effekte tunlichst auszuschalten, erfolgte die Einbringung in den Käfig bereits 24 Std vor Versuchsbeginn, und es wurde Wert darauf gelegt, daß während des Versuches ein möglichst gleichmäßiges Milieu (Fernhalten fremder Personen und Tiere, Fütterung usw.) beibehalten wurde.

Durch *ACTH-Gaben* (25 mg ACTH = Armour-Standard) kam es bei 4 Versuchshunden zu dem typischen Eos-Sturz mit Leukozytenanstieg (Thorn-Effekt).

Durch *Äther-Narkose* sanken die absoluten Werte der Eos bei 4 Versuchstieren innerhalb von 4—6 Std auf einen Tiefpunkt, der aber oberhalb 50% des Ausgangswertes lag, wohingegen die Gesamt-Leukozyten nur unwesentliche Schwankungen zeigten (Tab. 1).

In der *Pernokton-Narkose* (4 Versuchstiere, 2 cm³/kg Körpergewicht, davon $^2/_3$ langsam intravenös und $^1/_3$ intramuskulär injiziert) fanden wir eine Narkoseart, die keine wesentlichen Änderungen der Eos- und der Gesamtleukozyten-Zahlen hervorruft (Tab. 2). Diese Narkose wurde daher bei unseren Versuchen benutzt.

Durch Anlage eines Pneumoperitoneums während einer solchen Narkose überzeugten wir uns, daß durch zusätzliche Belastungen, auch

Tabelle 2. *Die Wirkung einer Pernokton-Narkose bei 4 Versuchstieren auf die Zahl der Gesamtleukozyten und Eosinophilen im peripheren Blut.*

Zeit:	5/51 Albert		6/51 Kai		7/51 Nora		8/51 Bella	
	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.
Vor Narkose:								
24 Std	7300	640	6000	500	8100	700	7400	550
18 Std	7400	630	6600	550	7600	750	7700	530
2 Std	7000	680	6600	550	8100	700	7300	590
1 Std	7300	600	6100	580	7500	740	7600	610
Narkose:								
Sofort	7100	600	6300	530	7700	700	7500	590
1 Std	7200	620	6400	570	7600	730	7300	550
2 Std	7200	570	6500	550	8100	700	7900	510
3 Std	7500	610	7000	510	7800	680	8300	570
4 Std	7800	530	7700	530	8000	650	7600	590
5 Std	7300	510	7600	420	8900	660	7800	650
6 Std	7200	500	6900	500	8000	730	7400	600
7 Std	7100	590	6900	540	7800	660	7200	590
8 Std	7000	620	6850	510	7700	680	7600	630
9 Std	7300	590	6200	590	8200	810	7600	590
10 Std	7000	600	6500	540	8000	840	7050	580
11 Std	7200	580	6600	530	7900	830	7500	620
12 Std	6700	600	7000	620	8000	—	7900	620
24 Std	6600	650	7050	490	7500	780	7300	590
30 Std	7300	600	7000	630	7700	820	8200	580

Tabelle 3. *Die Wirkung einer Pernokton-Narkose und eines Pneumoperitoneums bei 4 Versuchstieren auf die Zahl der Gesamtleukozyten und Eosinophilen im peripheren Blut.*

Zeit:	9/51 Albert		10/51 Kai		11/51 Nora		12/51 Bella	
	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.	Leuko	Eos.
Vor Narkose:								
24 Std	5000	630	7000	480	6800	600	5600	530
18 Std	5300	650	7500	530	6400	580	5700	580
3 Std	5000	610	6000	610	6300	620	5000	500
2 Std	5000	570	7100	610	7000	590	6050	520
1 Std	5400	620	6900	630	6200	640	5600	500
Nach Narkose u. Pneumoperitoneum:								
1 Std	4800	580	6000	550	6000	610	6300	570
2 Std	5300	520	8000	560	6600	400	5400	410
3 Std	6400	400	8900	400	6300	360	6000	260
4 Std	7700	400	8200	300	8000	440	6000	300
5 Std	7400	360	9500	420	7600	440	8000	300
6 Std	9400	400	8700	540	8600	530	6900	440
7 Std	10300	500	9100	480	7800	340	6900	400
8 Std	9600	590	10300	600	9900	430	8300	570
9 Std	9800	610	9200	570	8000	450	7000	600
10 Std	8000	600	9300	630	8000	450	7000	600
11 Std	9300	570	8100	600	7700	560	6000	670
12 Std	9000	600	8300	610	7300	570	7000	550
24 Std	6400	670	7000	510	7000	500	5000	500
30 Std	6600	660	6500	540	7000	480	5600	520

während dieser Narkose Eos- und Leukozyten-Änderungen auftreten (Tab. 3). (Gabrilove[11]).

Auch Gaben von ACTH rufen beim mit Pernokton narkotisierten Hund einen positiven Thorn-Effekt hervor.

Ergebnisse.

I.

Nach Selye[3] ist die Hämorrhagie ein Stressor, der das General-Adaptation-Syndrom in Gang setzt.

Wir haben an 10 Versuchstieren in Pernokton-Narkose Entblutungen bis zu 65% der Gesamtblutmenge (berechnet nach den bei Tigerstedt[12] angegebenen Indizes) durch Arteriotomie in kürzester Zeit vorgenommen. Bei allen Hunden kam es, wie aus Tab. 4 zu entnehmen ist, innerhalb der ersten 3 Std zu einem extremen Sturz der Eos. Bei 8 Tieren konnten wir zeitweise überhaupt keine Eos im peripheren Blut nachweisen. Der Wiederanstieg erfolgte bei den verschiedenen Tieren zeitlich ungleichmäßig. Die Gesamtleukozyten stiegen an. 2 Versuchstiere (18/51,

Tabelle 4. *Die Wirkung einer Pernokton-Narkose und zusätzlicher Entblutung bei 10 Versuchstieren auf die Gesamtzahl der Leukozyten und Eosinophilen im peripheren Blut; (EB = entzogene Blutmenge): *Leukozytose durch intest. Infekt. bedingt.*

Zeit:	13/51 Isabelle EB = 58%		14/51 Emil EB = 55%		15/51 Paul EB = 65%		16/51 Bello EB = 50%		17/51 Brutus EB = 45%	
	Leuko.	Eos.	Leuko.	Eos.	Leuko.	Eos.	Leuko.	Eos.	Leuko.	Eos.
1 Tag vor Entblutg.	7200	000	4600	400	6300	750	5300	600	5200	100
Kurz vor Entblutg.	7400	200	4900	500	6200	750	5700	750	5400	120
1 Std nach Entblutg.	—	—	5000	300	6700	000	5650	600	5100	100
2 Std nach Entblutg.	—	—	5300	100	6900	000	6100	300	6100	000
3 Std	12500	000	5900	000	7100	000	6800	150	—	—
4 Std	—	—	—	—	7900	000	7000	000	9300	000
5 Std	—	—	9200	000	8300	000	—	—	—	—
6 Std	—	—	10100	000	9000	50	6700	100	10000	000
7 Std	—	—	—	—	9100	120	—	—	—	—
24 Std	8700	000	8400	250	8700	250	6500	200	7300	500
48 Std	7100	550	8000	350	8300	300	11900*	000	6800	550
72 Std	6700	350	8300	400	8100	350	14000	200	5300	400
96 Std	7000	250	8100	450	7200	300	10300	100	6250	350

Zeit:	18/51 Harry EB = 60%		19/51 Grock EB = 60%		20/51 Nero EB = 38%		21/51 Cato EB = 60%		22/51 Omar EB = 65%	
	Leuko.	Eos.	Leuko.	Eos.	Leuko.	Eos.	Leuko.	Eos.	Leuko.	Eos.
1 Tag vor Entblutg.	5800	500	6300	600	7500	800	6400	600	7100	700
Kurz vor Entblutg.	6100	650	6000	600	7600	750	6200	560	6900	730
1 Std nach Entblutg.	6600	150	6800	100	—	—	6600	320	7200	520
2 Std nach Entblutg.	6900	500	8000	000	—	—	6900	100	7500	210
3 Std	†	†	8500	250	—	—	7000	000	8000	000
4 Std			†	†	—	—	8200	000	8750	000
5 Std					—	—	9700	000	9200	000
6 Std					—	—	10100	000	10350	000
7 Std					—	—	9900	000	10050	50
24 Std					10300	650	9100	100	9100	270
48 Std					10600	1060	8400	150	8700	430
72 Std					12000	1000	7900	350	7400	570
96 Std					10200	850	7500	400	7300	670

19/51) kamen innerhalb 4 Std nach der Entblutung ad finem. Es ist bemerkenswert, daß kurz vor dem Tode die Eos wieder anstiegen.

Bei einer Hämorrhagie scheint uns der Blutdruckabfall ein wesentlicher Bestandteil des Krankheitsgeschehens zu sein. Wir haben uns

dafür interessiert, wie sich die Leukozyten- und Eos-Verhältnisse bei Blutdruckschwankungen gestalten. Zu diesem Zweck haben wir in Pernokton-Narkose (7 Versuchstiere) beide Sinus carotici, unter sorgfältiger Schonung der Nerven und der Nervi vagi, freigelegt. Durch Abklemmung beider Sinus wurden die bekannten Blutdruckschwankungen ausgelöst, die je nach Abklemmungsdauer in unseren Versuchen 15—120 min betrugen. Während, die Gesamtdauer des Versuches betrachtet, die Eos einen unwesentlichen Abfall und die Leukozyten einen Anstieg zeigen, tritt jeweils *sofort* nach Lösung der Klemmen (die mit einem Blutdruck-

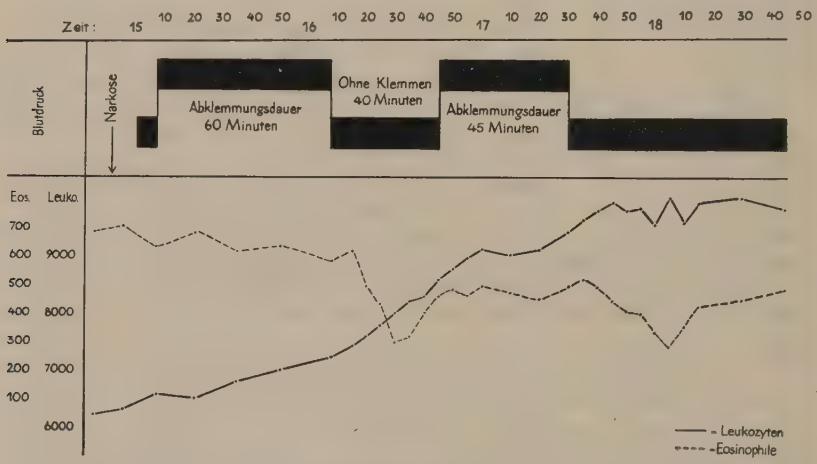


Abb. 2. Hund Lupus, 26/51, 9,5 kg, Pernokton-Narkose, zeigt das Verhalten der Gesamtleukozyten und Eosinophilen nach 2maligem Abklemmen beider Sinus carotici.

abfall des Versuchstieres einhergeht) eine prompte und deutliche Abnahme der Eos ein. Nach 10—30 min ist der Ausgangswert wieder fast erreicht. Dieser Effekt ist (Abb. 2) wiederholbar.

II.

Es interessiert natürlich zu erkennen, wie dieser Eos-Sturz zustande kommt. In der Literatur konnten wir darüber keinerlei konkrete Angaben finden.

Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß die Eos in einem Organ retiniert werden, oder daß sie irgendwo im Organismus völlig zerstört werden oder lediglich ihren Charakter verlieren. Diesbezügliche Organuntersuchungen führten zu keinem Ergebnis.

Nunmehr wurden an drei Versuchshunden in Pernokton-Narkose bei eröffnetem Abdomen und nach Art. carotis-Abklemmung bzw. Abnahme der Klemme die Eos im Blut verschiedener Gefäße gezählt. In der

schematischen Darstellung des einen Versuches (Abb. 3) sind die Zellzahlen, die in dem jeweils punktierten Gefäß gefunden wurden, eingetragen. Man findet, wie auch bei obigen Versuchen (Abb. 2), nach Blutdrucksturz die schon geschilderte Abnahme der Eos in allen untersuchten Gefäßgebieten. Jedoch fällt auf, daß die Eosinophilenwerte in der Vena

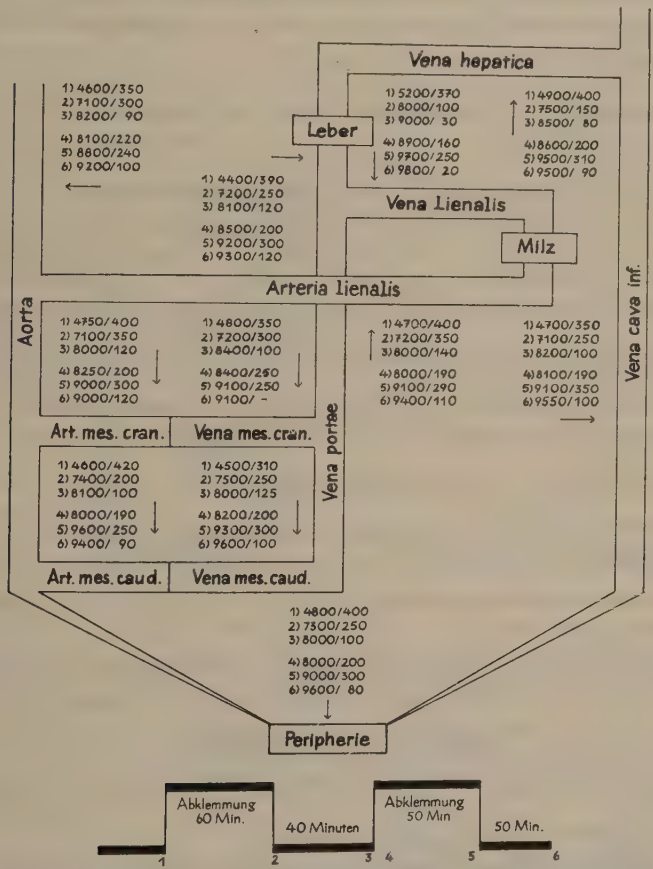


Abb. 3. Hund Kurt, 27/51, 12 kg, Pernokton-Narkose, Laparotomie. Abklemmung beider freigelegten Sinus carotici, Zählung der Gesamtleukozyten und Eosinophilen bei: 1. vor Abklemmung; 2. nach Klemmenentfernung; 3. 40 min nach Klemmenentfernung; 4. 10 min nach erneuter Abklemmung; 5. sofort nach Klemmenentfernung; 6. weitere 50 min später.

lienalis bei weitem niedriger liegen als in den anderen Gefäßgebieten [Abb. 3: 30, 20 Eos in der Vena lienalis gegenüber 80, 90 in der Vena hepatica (die Mischblut aus der Milz (!) und dem restlichen Reflux enthält), 90—120 Eos im Blut der übrigen Gefäße]. Auch bei zweimal hintereinander durchgeführter Carotisabklemmung findet man dieselbe Verteilung.

Von der Erkenntnis ausgehend, daß die Milz somit als *Filter* für die Eos wirksam ist, haben wir bei 2 Hunden eine Splenektomie vorgenommen und (nach Ausheilung bei normalen Blutzellzahlen) feststellen können, daß nunmehr der Eos-Abfall nach ACTH-Gaben bedeutend später eintritt und von kürzerer Dauer ist als vor der Operation.

Abb. 4 zeigt den Versuchsverlauf mit seinem deutlichen Unterschied auf. Ein in seinen zeitlichen Relationen deutlich verminderter Eos-Abfalll ist nach der Splenektomie erkennbar.

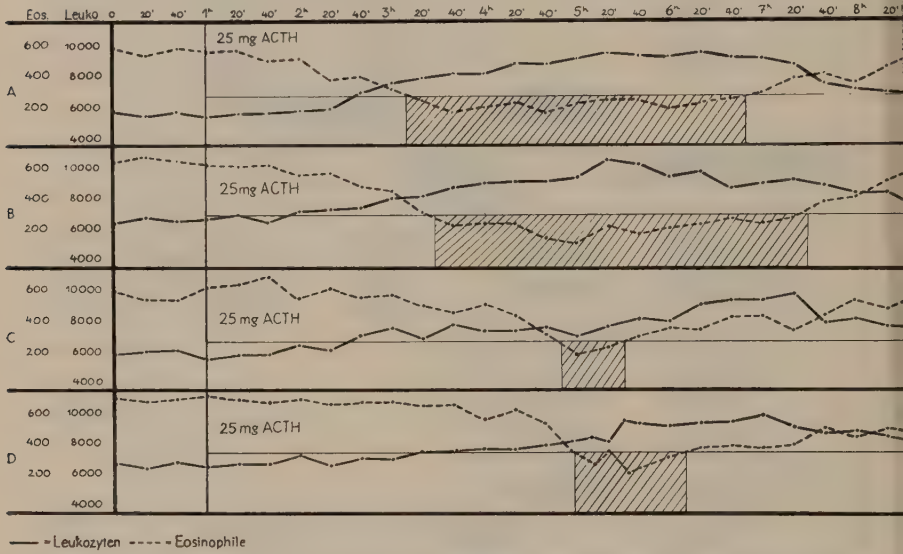


Abb. 4. Hund Xaver, 30/51, 14 kg, zeigt das Verhalten der Gesamtleukozyten und Eosinophilen nach einmaliger Gabe von 25 mg ACTH. Kurve A und B vor, Kurve C und D nach Splenektomie. Schraffiert die Verweildauer der Eosinophilen unter 50% des Ausgangswertes.

Besprechung der Ergebnisse.

Aus obigen Versuchen geht zunächst hervor, daß durch Blutdruckschwankungen

1. ein Abfall der Eos resultiert und daß
2. die Milz bei diesem Geschehen eine wesentliche Rolle spielt.

Wenn man auch bei dieser klaren Situation geneigt sein könnte, dem Blutdruckabfall als solchem eine ausschlaggebende Rolle für die Eos-Reaktion zuzuschreiben, so darf nicht übersehen werden, daß durch die Reizung des Sinus caroticus ein recht mannigfaltiges Geschehen in Gang gesetzt wird (Heymans[13]). Kreislaufmechanische Umstellungen, Reizung von nervösen (auch vegetativen) Zentren und Auslösung von hormonalen Regulationen sind bei Sinusreizung erwiesen. Welchem Faktor oder welchen Faktoren der Eos-Sturz zugeschrieben werden muß, ist unseres Erachtens noch nicht zu entscheiden.

Klarer umrissen erscheint uns die Tätigkeit der Milz in diesem Geschehen. Während des Blutdruckabfalles fließen Eosinophile in sie hinein, aber es kommen nicht mehr alle heraus oder sie sind zum mindesten nach der Methode von Randolph nicht mehr erkennbar. Aber auch hier bleibt eine außerordentlich wichtige und interessante Frage offen: Werden die Eos in der Milz in toto verhaftet, oder werden sie lediglich ihres Charakters beraubt.

Beiglböck[14] z. B. weist auf die Möglichkeit hin, daß die Aminooxydase durch Angriff auf den Spermingehalt der Eos. diese verändert. Lauda[15] erwähnt Beobachtungen von Schittenhelm und Ehrhardt[16] und von Kulka[17], die nach Splenektomie Eosinophilie beobachteten. Dieser Befund weist in demselben Sinn auf die Funktion der Milz hin. Die Beeinflussung der Eos. durch Milzextrakt, wie sie Mayr und Moncorps[18] nachgewiesen haben, spricht in demselben Sinn.

Unsere Beobachtung, daß nach Milzexstirpation noch ein Abfall der Eos, wenn auch zeitlich in geringerem Umfang, auftritt, zeigt auf, daß die Milz nicht als *einziges* Organ verantwortlich zeichnet. Der Schluß liegt nahe, daß das gesamte RES Anteil nimmt. Tischendorf[19] erwähnt, daß in manchen Lymphknoten bei allergischen Allgemeinreaktionen die Eos sehr zahlreich sind, wobei nicht zu entscheiden ist, ob sie dort gebildet oder nur eingeschwemmt werden. Die Kontrolle der gesamten RES-Wirksamkeit war uns mangels geeigneter Methodik, noch nicht möglich.

Zusammenfassung.

1. In Hundeversuchen kann durch Entblutung, Narkosetrauma und ACTH-Gaben die bekannte Wirkung auf die Eosinophilen-Zahl bestätigt werden.

2. Durch Karotiden-Abklemmung und -Öffnung bzw. die dadurch hervorgerufenen Blutdruckschwankungen konnte Eosinopenie erzielt werden.

3. Nach unseren Versuchen muß die Milz als ein Ort angesehen werden, an dem eine Verminderung der Eosinophilen-Zahlen beim Blutdruckabfall bewirkt wird. Nicht entschieden wurde, ob die Eosinophilen dort arretiert oder nur entartet bzw. zerstört werden.

4. Versuche an milzexstirpierten Hunden bestätigen die Bedeutung der Milz für das Verschwinden der Eosinophilen, zeigen jedoch, daß die Milz nicht der einzige Ort der Wirksamkeit ist. Es liegt die Vermutung nahe, daß das gesamte RES beteiligt ist.

Literatur.

[1] Heilmeyer, L.: Lehrbuch der spez. path. Phys. Jena 1940. — [2] Hoff, F.: Lehrbuch der spez. path. Phys. Jena 1940. — [3] Selye, H.: The Physiology and Pathology of Exposure to Stress. Montreal 1950. — [4] Thorn, G. W., P. H. Forsham, F. T. Frawley, S. R. Hill, M. Roche, D. Staehlin and D. L. Wilson: New England J. Med. **224**, 783 (1950); Thorn, G. W., P. H. Forsham, F. T. G.

Prunty and A. G. Hills: JAMA **137**, 1005 (1948). — [5] Dougherty, White: Endocrinology (Am) **36**, 16 (1945). — [6] Vries, Herbert: Endocrinology (Am) **44**, 259 (1949). — [7] Hauss, W. H.: Klin. Wschr. **28**, 537 (1950). — [8] Hauss, W. H. u. H. Losse: 57. Tgg. d. Deutschen Gesellschaft für innere Medizin. 1951. — [9] Randolph: J. Allergy **15**, 89 (1944). — [10] Dunger: Münch. med. Wschr. **57**, 1942 (1910). — [11] Gabrilove, J. L.: J. clin. Endocrin. **10**, 637 (1950). — [12] Tigerstedt: Phys. d. Kreislaufs. Berlin 1923. — [13] Heymans, C., J. J. Bouckaert u. P. Regniers: Le Sinus Carotidien. Paris 1933. — [14] Beiglböck, W., H. Hoff, R. Clotten: Zur Frage der Cortison-Wirkung, Augsburg 1950. — [15] Lauda, E.: Phys. d. Milz. Berlin-Wien 1933. — [16] Schittenhelm u. Ehrhardt: Zit. bei Lauda: Phys. d. Milz. Berlin-Wien 1933. — [17] Kulka: Dtsch. Z. Chir. **219**, 119 (1929). — [18] Mayr u. Moncorps: Münch. med. Wschr. **1926**, 1777. — [19] Tischendorf, W.: Morph. klin. Beob. bei Erkr. d. lymph. Gew. Leipzig 1942.

Prof. Dr. W. H. Hauss, Dr. med. H. Kreuziger, Dr. med. L. Lammers, I. Mediz. Universitäts-Klinik, Frankfurt a. M.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 93—102 (1951).

(Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Innsbruck und dem Pharmakologischen Institut der Farbwerke Hoechst.)

Neue synthetische Verbindungen der „Polamidonreihe"* mit parasympathicolytischer Wirkung.

Von

O. Schaumann und E. Lindner.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Juni 1951.)

Die Suche nach einem synthetischen „Atropinersatz" hat bekanntlich zur Erschließung einer neuen Klasse von hochwirksamen Analgetica geführt[1]. Gleichzeitig wurde von anderen Vorstellungen ausgehend eine Reihe analgetisch wirkender Verbindungen entwickelt, die sich vom Diphenylmethan ableiten[2]. Es ist vielleicht kein Zufall, daß sich in Amiden dieser Verbindungsreihe, aus der das 6-Dimethylamino-4, 4-diphenylheptanon unter der Bezeichnung „Polamidon" und zahlreichen anderen Handelsnamen sich einen bedeutsamen Platz in der Schmerzbekämpfung erobert hat, überraschenderweise Verbindungen fanden, die unter Verlust der schmerzstillenden Wirkung in hohem Maße parasympathikolytische Eigenschaften besitzen und dadurch den Kreis zum Ausgangspunkt wieder schließen.

Die in dieser Beziehung wirksamste Verbindung, das Piperidinoäthyldiphenyl-azetamid (Hoechst 9980, Formel II, siehe Tab. 2) erreicht in seiner parasympathikolytischen Wirkung das Atropin, ja übertrifft es sogar in mancher Beziehung. Es seien daher im folgenden kurz die wichtigsten Eigenschaften dieser neuen Verbindung (im folgenden kurz als Hö 9980 bezeichnet) beschrieben.

Wirkung am Darm:

Die vagotrop-spasmolytische Wirkung am nach Magnus isolierten Meerschweinchen-Enddarm wurde nach dem Vorgehen von Miller, Becker und Tainter[3] untersucht. Es wurden vergleichsweise die Konzentrationen von Atropin und Hö 9980 bestimmt, welche den durch Lentin $1:13{,}3 \cdot 10^6$ kontrahierten Darm zu $^2/_3$ entspannten. Von beiden Verbindungen wurden je 4 verschiedene Konzentrationen an je 20 Darmstücken geprüft. Die Logarithmen der verwendeten Verdünnungen

Die Präparate wurden im pharmazeutisch-synthetischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst von Herrn Prof. Dr. Ehrhart dargestellt.

* Eingetr. Warenzeichen.

wurden als Abszisse, die Zahl der bei der betreffenden Verdünnung zu $^2/_3$ entspannten Darmstücke als Ordinate aufgezeichnet. Das so erhaltene Diagramm (Abb. 1) zeigt, daß der Logarithmus der mittleren wirksamen Verdünnung für Atropin bei 9,0, für Hö 9980 bei 9,27 liegt. Das entspricht Verdünnungen von $1:1 \cdot 10^9$ bzw. $1:1{,}86 \cdot 10^9$. Die statistische Auswertung ergab für die Logarithmen einen mittleren Fehler von $\pm 0{,}08$ bzw. $\pm 0{,}09$. Für die Signifikanz errechnet sich daraus ein K von 2,3. Die gefundene Differenz ist daher signifikant.

Am Lentinspasmus des isolierten Meerschweinchendarms ist Hö 9980 somit rund doppelt so wirksam wie Atropin.

In situ wird der durch 150 γ/kg im. Lentin hervorgerufene Spasmus des Meerschweinchendickdarmes durch 0,03 mg/kg Hö 9980 i.v. gelöst. Atropin beseitigt den Spasmus in der gleichen Konzentration mit 0,06 mg/kg i.v. Auch hier ist also Hö 9980 doppelt so wirksam wie Atropin.

Nach dem Vorgehen von Brown und Werner[4] erhielten Ratten einen 1%igen Kohlebrei mit einem Zusatz von 3% Adulsion per os. 30 min nach der Fütterung wurden die Tiere getötet, der Dünndarm herausgenommen, die Gesamtlänge des Dünndarms und die Länge des Darmteiles gemessen, den der Kohlebrei in der Versuchszeit durchwandert hatte.

Bei 20 Kontrolltieren ergab sich eine Wanderungsstrecke von 80,2% der gesamten Dünndarmlänge.

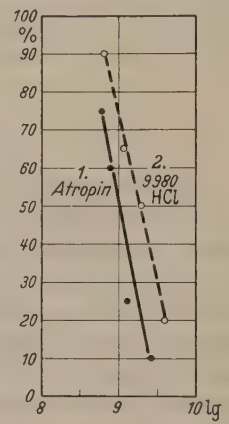


Abb. 1. Spasmolyse am Meerschweinchendickdarm gegen Lentin. Dosiswirkungskurve gegenüber dem durch Lentin in der Konzentration 1 : 13,3 Millionen erzeugten Spasmus des Meerschweinchendickdarms für Atropin und Hö 9980. Abszisse: Log desreziproken Wertes der Konzentration. Ordinate: Prozentzahl der zu $^2/_3$ entspannten Darmstücke. Kurve 1: Atropin, Kurve 2: Hö 9980 HCl. Von 20 Darmstücken gewonnene Werte.

20 Ratten erhielten 20 min vor der Fütterung 250 γ/kg Hö 9980 s.c. Bei ihnen betrug die Wanderungsstrecke 60,9% $\pm$ 3%. 14 mit 250 γ/kg Atropin injizierte Ratten zeigten eine Wanderungsgeschwindigkeit von 48% $\pm$ 3,9%. Die Signifikanz der Differenz beträgt 2,6. Bei der Ratte wirkt das Hö 9980 in vivo am Darm also etwas schwächer als Atropin.

Prüfung an der Tränensekretion der Ratte nach β-Methylcholin.

Wie Winbury, Schmalgemeier und Hambourger[5] sowie Burgen[6] angegeben haben, kommt es nach intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg β-Methylcholinazetat an der Ratte zu einer heftigen Sekretion rötlich gefärbter Tränenflüssigkeit. Die Tränensekretion tritt bereits innerhalb von 2 min nach der Injektion auf und hält dann einige

Minuten an. Die rötliche Färbung des Sekretes ist nach Burgen durch Proto- und Koproporphyrin bedingt. Die Injektionen können mit dem gleichen Effekt alle 30 min wiederholt werden.

Es wurde nun die Dosis der zu prüfenden Verbindungen ermittelt, die gerade imstande ist, diese Wirkung des Methylcholins zu hemmen. Zu jedem Versuch wurden 6 Ratten benützt. Die Injektion des Methylcholinazetats erfolgte 20, 50 und 80 min nach der subkutanen Injektion der zu prüfenden Verbindung.

Die kleinste Dosis, die gerade noch die Tränensekretion verhinderte, betrug für Atropin und Hö 9980 0,3 mg/kg s.c. Nach 50 min reagierten bei beiden Präparaten zwei von 6 Tieren mit leichter Tränensekretion, nach 80 min bei Atropin alle Tiere und bei Hö 9980 5 von 6 Tieren.

Hö 9980 und Atropin sind in diesem Test ungefähr wirkungsgleich.

Hemmung der Speichelsekretion.

Die Verbindung hemmt auch stark die Speichelsekretion. Kaninchen von 2—3 kg Gewicht wurden mit 50 mg/kg Pernokton i.m. narkotisiert und erhielten s.c. 50 cm^3 physiologische Kochsalzlösung injiziert. 20 min später wurde 1 mg/kg Pilokarpinum hydrochloricum i.v. gegeben. Der sezernierte Speichel wurde aufgefangen und alle 10 min gemessen. Nach Tripod[7] werden von Kaninchen unter diesen Versuchsbedingungen gleiche Speichelmengen abgesondert, wenn sie im Abstand von 3 Std nochmals Pilokarpin injiziert erhalten, was wir bestätigen konnten. Es wurde daher 3 Std später der Versuch am gleichen Tier in derselben Weise wiederholt, nachdem es 20 min vor der Pilokarpin-Injektion Atropin bzw. Hö 9980 s.c. injiziert erhalten hatte. Gruppen von je 4 Tieren wurden jeweils mit der gleichen Dosis des zu prüfenden Präparates vorbehandelt.

Tab. 1 gibt die so mit verschiedenen Dosen der beiden Verbindungen erhaltenen Durchschnittswerte wieder. Aus den Zahlen kann man erkennen, daß bezüglich der Abnahme der Speichelsekretion im Vergleich zum Vorversuch auch hier Hö 9980 etwa doppelt so wirksam ist wie Atropin. Außerdem hält die Wirkung beträchtlich länger an.

Meerschweinchenvorhof:

Am isolierten rechten Vorhof des Meerschweinchenherzens wurde die negativ inotrope und chronotrope Wirkung von Azetylcholin 1:8 Millionen durch Hö 9980 in einer Konzentration von 1:20 Millionen aufgehoben. Atropin hatte dieselbe Wirkung erst bei einer Konzentration von 1:10 Millionen. Hö 9980 ist also auch hier doppelt so wirksam wie Atropin.

Tabelle 1. *Speichelsekretion bei Kaninchen nach Pilocarpin allein und nach Injektion verschiedener Dosen Atropin. Die Zahlen stellen die Mittelwerte der Speichelmenge von 4 Tieren in cm³ dar.*

Atropin

1. Versuch.

Zeit in min	Kontrolle 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Hauptversuch 50 γ Atropin/kg s.c. 20 min später 1 mg Picolocarpin/kg i.v.	Differenz
10	13,6	7,1	— 6,5
20	4,05	2,35	— 1,7
30	1,35	1,68	+ 0,33
40	0,45	0,68	+ 0,23
50	0,15	0,27	+ 0,12
60	0,03	0,13	+ 0,10
70	0	0,08	+ 0,08
80	0	0	
90	0	0	

2. Versuch.

Zeit in min	Kontrolle 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Hauptversuch 100 γ Atropin/kg s.c., 20 min später 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Differenz
10	12,4	3,75	— 9,65
20	6,82	3,8	— 3,02
30	2,4	3,0	+ 0,60
40	1,5	0,73	— 0,77
50	0,37	0,05	— 0,32
60	0,08	0	— 0,08
70	0,15	0	— 0,15
80	0	0	
90	0	0	

3. Versuch.

Zeit in min	Kontrolle 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Hauptversuch 125 γ Atropin/kg s.c., 20 min später 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Differenz
10	9,4	0	— 9,4
20	2,5	0	— 2,5
30	1,38	0	— 1,38
40	0,33	0	— 0,33
50	0	0	
60	0	0	
70	0	0	
80	0	0	
90	0	0	

Präparat Hö 9980 HCl

Speichelsekretion bei Kaninchen nach Pilocarpin allein und nach Injektion verschiedener Dosen Hö 9980 HCl. Die Zahlen stellen die Mittelwerte der Speichelmenge von 4 Tieren dar.

1. Versuch.

Zeit in min	Kontrolle 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Hauptversuch 50 γ Hö 9980 HCl/kg s.c., 20 min später 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Differenz
10	11,8	5,2	— 6,6
20	3,7	1,72	— 1,98
30	1,17	0,48	— 0,69
40	0,88	0,15	— 0,73
50	0,48	0,03	— 0,45
60	0,33	0	— 0,33
70	0,13	0	— 0,13
80	0	0	
90	0	0	

2. Versuch. *Die Zahlen stellen die Mittelwerte der Speichelmenge von 8 Tieren dar.*

Zeit in min	Kontrolle 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Hauptversuch 100 γ Hö 9980 HCl/kg s.c., 20 min später 1 mg Pilocarpin/kg i.v.	Differenz
10	12,2	0,46	— 11,74
20	3,18	0,08	— 3,10
30	1,22	0,03	— 1,19
40	0,81	0,01	— 0,80
50	0,3	0	— 0,3
60	0,24	0	— 0,24
70	0,19	0	— 0,19
80	0,13	0	— 0,13
90	0,08	0	— 0,08

Blutdruck:

Die Abschwächung der Azetylcholinwirkung auf den Blutdruck wurde an der Katze in Pernoktonnarkose geprüft. Es wurden zunächst 10 γ/kg Hö 9980 i.v. und dann in Intervallen von jeweils 20 min zusätzlich 15 γ, 25 γ, 50 γ und 100 γ/kg injiziert. Die Gesamtdosen betrugen demnach 10 γ, 25 γ, 50 γ, 100 γ und 200 γ/kg. Vor Injektion und nach jeder der angegebenen Dosen von Hö 9980 wurde die Blutdrucksenkung durch Standarddosen von Azetylcholin, die von 0,1—10 γ variiert wurden, gemessen. Abb. 2 gibt die erhaltenen Resultate als Mittelwerte von 7 Versuchen wieder. 10 γ/kg Hö 9980 reduzieren die Blutdrucksenkung durch 0,1 γ Azetylcholin von 35 mm auf 3,5 mm und die maximale Senkung durch 10 γ Azetylcholin von 69,5 mm auf 53,5 mm. Nach 200 γ/kg

Hö 9980 wird die Blutdrucksenkung von 2 γ Azetylcholin noch vollständig aufgehoben, die durch 10 γ Azetylcholin auf 18 mm reduziert.

Am Hund in Pernoktonnarkose wird die Wirkung einer Reizung des peripheren Vagusstumpfes durch 1 mg/kg Hö 9980 i.v. stark abgeschwächt; aber selbst mit 18 mg/kg i.v. bleibt noch eine schwache Blutdrucksenkung und mäßige Bradykardie nach Vagusreizung erhalten.

Der normale Blutdruck des Kaninchens in Pernoktonnarkose wird durch Dosen bis 3 mg/kg Hö 9980 i.v. nicht beeinflußt. An der Urethankatze führen 0,8 mg/kg Hö 9980 i.v. zu einer leichten Blutdrucksteigerung, während die gleiche Dosis Atropin den Blutdruck senkt.

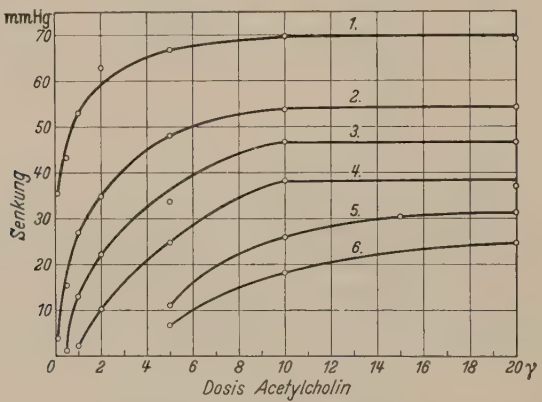


Abb. 2. Beziehung zwischen der blutdrucksenkenden Wirkung des Azetylcholins und verschiedenen Dosen des Hö 9980 HCl. Durchschnittswerte von 7 Katzen. Abszisse: Dosis Azetylcholin, Ordinate: Blutdrucksenkung in mm. Kurve 1: Blutdrucksenkung nach Injektion des Azetylcholins i.v. allein, Kurve 2: Blutdrucksenkung nach Injektion des Azetylcholins nach vorheriger i.v. Injektion von 10 γ/kg Hö 9980, Kurve 3: Blutdrucksenkung nach Injektion von insgesamt 25 γ/kg Hö 9980, Kurve 4: Blutdrucksenkung nach Injektion von insgesamt 50 γ/kg Hö 9980, Kurve 5: Blutdrucksenkung nach insgesamt 100 γ/kg Hö 9980, Kurve 6: Blutdrucksenkung nach insgesamt 200 γ/kg Hö 9980.

Bronchien.

Der schwere Asthmaanfall, der beim Meerschweinchen durch Inhalation einer fein vernebelten Lösung, die im cm^3 2 mg Azetylcholin, 2 mg Pilokarpin und 1 mg Eserin enthielt, ausgelöst wird, kann durch vorherige s.c. Injektion von 0,25 mg/kg Hö 9980 verhindert werden.

Auge.

Am Katzenauge führt ein Tropfen einer Lösung von Hö 9980 1:5000 in den Bindehautsack zu einer deutlichen Pupillenerweiterung; bei Atropin genügt zum gleichen Effekt bereits eine Verdünnung von 1 : 20000. Hier ist also Hö 9980 beträchtlich weniger wirksam als Atropin.

Toxizität.

An Mäusen beträgt für Hö 9980 die DL 50 bei i.v. Injektion 54 mg/kg, während für Atropin unter gleichen Bedingungen eine DL 50 von

88 mg/kg gefunden wurde. Das Verhältnis der toxischen Dosen liegt mit 1 : 1,6 in der gleichen Größenordnung wie das an den meisten Testobjekten gefundene Verhältnis der Wirkungsstärken. Der Tod erfolgt unter Krämpfen und nachfolgender Atemlähmung. Am Hund rufen 20 mg/kg s. c. noch keine auffälligen Vergiftungserscheinungen hervor.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Das Piperidinoaethyl-diphenyl-azetamid (Hö 9980) zeigt wieder, wie schwierig es ist, Rückschlüsse von Änderungen im chemischen Aufbau auf Änderungen in der Pharmakodynamik zu machen. Während z. B. in der Reihe der Phenylpiperidin-Verbindungen („Dolantin"-Reihe*) der Übergang vom Äthylester („Dolantin") zum Amid (Hö 9375, Formel III, auf Tab. 2) die negativ vagotrope Wirkung so gut wie aufhebt, führt die gleiche Änderung in der „Polamidon"-Reihe zu einer Steigerung der spezifischen vagotropen Wirkung um das Mehrhundertfache (vgl. Tab. 2, Hö 9496, Formel IV gegen Hö 9980, Formel II). Die analgetische Wirkung geht dabei in beiden Fällen vollständig verloren.

Bezüglich der basischen Seitenkette liegt das Optimum beim Piperidinoaethyl. Verkürzung der N-Alkylgruppen führt über die Diaethylaminoaethyl-(Hö 10342, Formel V) und die dem Polamidon entsprechende Dimethylamino-Verbindung (Hö 10804, Formel VI) zu einer starken Abnahme der vagotropen Wirkung. Auch die Einführung einer Methylgruppe in die den Stickstoff tragende Seitenkette zur Piperidino-Isopropylverbindung (Hö 11628, Formel VII) führt zu einer Abnahme der vagotropen Wirkung auf etwa $^1/_{10}$. Es ist dies bemerkenswert, da beim Aethylketon die gleiche Änderung zu einer Steigerung der analgetischen Wirkung führt (Hö 10582, Formel VIII gegen Hö 10820 [Polamidon]). (IX) Die Hydrierung eines Phenylkerns (Hö 10343, Formel X) verursacht eine Verminderung der vagotropen Wirkung auf nahezu $^1/_{100}$.

Die dem Atropin so weitgehend gleichenden pharmakodynamischen Eigenschaften der neuen Verbindung geben der Theorie von der Konkurrenzhemmung, die zur Erklärung des Wirkungsmechanismus der Azetylcholinhemmung gerne herangezogen wird, einen argen Stoß. Während bei Atropin und den bis zu einem gewissen Grad atropinähnlich wirkenden synthetischen Verbindungen, wie *Syntropan** (XIII) oder *Trasentin** (XII), noch insofern eine gewisse Ähnlichkeit mit der Konstitution des Azetylcholins besteht, als es sich bei allen diesen Verbindungen um Ester basischer Alkohole handelt, ist eine solche Beziehung bei Amiden basisch substituierter Diphenylessigsäuren nicht mehr herzustellen. Auch zu dem pharmakodynamisch so ähnlich wirkenden Atropin besteht keine tragfähige Brücke mehr.

* Eingetr. Warenzeichen.

Tabelle 2.

Spasmolyse am Meerschweinchendickdarm gegenüber Histamin, Lentin in der Konzentration 1:13,3 Millionen, gegenüber Bariumchlorid in der Konzentration 1:8000. Analgetische Wirkung an der Maus. Die Werte sind Vergleichswerte zu Dolantin.

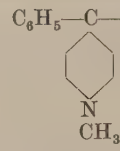
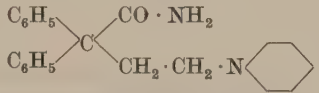
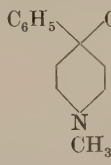
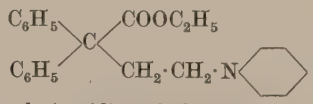
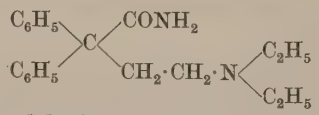
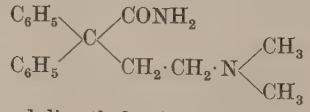
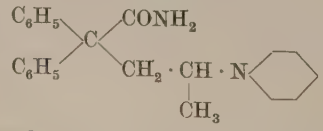
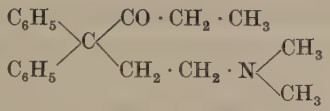
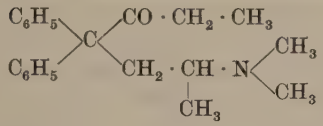
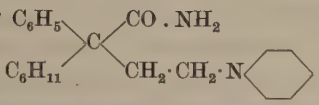
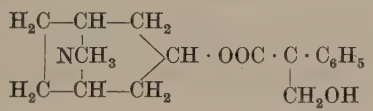
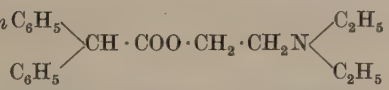
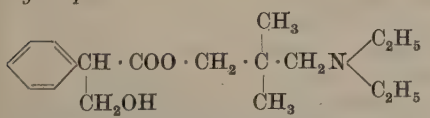
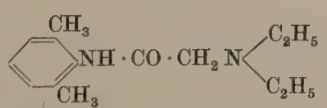
Vers. Nr.	Formel		Spasmolyse			Analgesie
			Lentin	Ba	Histam.	
8909 (Dolantin)		(1)	1	1	1	1
1-Methyl-4-phenyl-piperidin-4-carbonsäure-äthylester						
9980		(2)	520	$^1/_3$	$^1/_{10}$	0
Diphenyl-piperidinoäthyl-azetamid						
9375		(3)	$^1/_{50}$	$^1/_{10}$	$^1/_{100}$	0
1-Methyl-4-phenyl-piperidin-4-carbonsäureamid						
9496		(4)	1	3	1	$^1/_2$
Diphenyl-piperidinoäthyl-essigester						
10342		(5)	130	$^1/_4$	$^1/_{10}$	0
Diphenyl-diäthylaminoäthyl-azetamid						
10804		(6)	25	$^1/_2$	5	0
Diphenyl-dimethylaminoäthyl-azetamid						
11628		(7)	30	$^1/_2$	$^1/_{10}$	0
Diphenyl-piperidinoisopropyl-azetamid						

Tabelle 2 (Fortsetzung).

Vers. Nr.	Formel		Spasmolyse			Analgesie
			Lentin	Ba	Histam.	
10582		(8)	1/3	1	1/2	3
1-Dimethylamino-3,3-diphenyl-hexanon(4)						
10820		(9)	1/3	3/4	1	10
1-Dimethylamino-4,4-diphenyl-heptanon (Polamidon)						
10343		(10)	6	1/6	2/3	0
Phenyl-cyclohexyl-piperidino-äthyl-azetamid						
Atropin		(11)	280	1/3	2/3	0
Trasentin		(12)				
Diphenylessigsäure-diäthylamino-äthylester						
Syntropan		(13)				
Tropasäure-Ester des 3-Diäthylamino-2,2-dimethyl-propanol (1)						
Xylocain		(14)				
ω-Diäthylamino-2,6-dimethylazetanilid						

Ähnliche Verhältnisse bestehen übrigens auch bei den Lokalanaesthetiticis. Auch hier finden wir in Amiden basisch substituierter Säuren, wie *Percain** oder *Xylocain** (8) ω-Diaethylamino-2,6-dimethylazetanilid, (N. Löfgren, Inaug. Diss. Stockholm 1948) (XIV) stark wirksame Verbindungen, wenn auch hier noch eher, allerdings mühsam und wenig überzeugend, zu den Estern aromatischer Säuren mit basischen Alkoholen eine Brücke zu schlagen wäre.

Auch das hier besprochene Amid (Hö 9980) besitzt übrigens eine lokalanaesthetische Wirksamkeit von der Größenordnung des Novokains, wie sich an der Hautquaddel am Meerschweinchen zeigen ließ.

Die bisherigen experimentellen Erfahrungen mit der neuen Verbindungsklasse lassen uns wieder erkennen, auf wie schwachen Füßen unsere Erkenntnisse betreffs des Zusammenhangs zwischen Konstitution und Wirkung stehen und daß wir hier auf immer neue Überraschungen gefaßt sein müssen.

Zusammenfassung.

1. Es werden die pharmakodynamischen Eigenschaften einer neuen Verbindungsklasse, der Amide basisch substituierter Diphenylessigsäuren, beschrieben.

2. Die wirksamste Verbindung dieser Reihe, das Piperidinoäthyldiphenylazetamid, hat parasympathikolytische Eigenschaften von der Größenordnung des Atropins.

3. Es werden einige Zusammenhänge zwischen Konstitution und Wirkung in dieser Reihe und im Verhältnis zu chemisch nahe verwandten Verbindungen besprochen.

4. Es wird auf Grund der neu gewonnenen Erkenntnisse auf die Problematik bezüglich Konstitution, Wirkung und Wirkungsmechanismus hingewiesen.

Literatur.

[1] Eisleb, O., u. O. Schaumann: Dtsch. med. Wschr. **1939**, S. 967; Schaumann, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 109 (1940). — [2] Ehrhart, G., u. O. Schaumann: Med. Mschr. **8**, 605 (1949); Bockmühl, M., G. Ehrhart u. O. Schaumann: Liebigs Annalen **561**, 52 (1949). — [3] Miller, Becker u. Tainter: J. of Pharmacol. **92**, 260 (1948). — [4] Brown u. Werner: J. of Pharmacol. **97**, 2 157. — [5] Winbury, Schmalgemeier, Hambourger: J. of Pharmacol. **95**, 53 (1948). — [6] Burgen: Brit. J. Pharmacol. **4**, 185 (1949). — [7] Tripod: Helvet. physiol. Acta **7**, 135 (1949). — [8] Löfgren, N.: Inaug. Diss. Stockholm 1948.

* Eingetr. Warenzeichen.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 103—108 (1951).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen und dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

Zum inaktiven Hämoglobin des Blutes.

Von

FRITZ JUNG und ROBERT KUON.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 31. Mai 1951.)

Nach den Untersuchungen von HEUBNER und Mitarbeitern ist das inaktive Hämoglobin des Blutes mit hoher Wahrscheinlichkeit Methämoglobin. Da dem letzteren die Fähigkeit zukommt, den Zerfall des Chloratjons relativ spezifisch zu katalysieren (HEUBNER und JUNG[1]), läßt sich aus der spontanen Umsetzung von Chlorat mit Blut ein Rückschluß auf den primären Hb(3)-gehalt des Blutes ziehen. Über derartige Versuche soll hier berichtet werden. Im Rahmen dieser Versuche kam auch eine gewisse Unstimmigkeit zwischen früheren eigenen Versuchen und Beobachtungen von KIESE[2] zur Klärung. KIESE gibt nämlich an, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Umsetzung zwischen Hämoglobin und Chlorat der Chloratkonzentration direkt proportional ist, in eigenen Versuchen hatte sich dagegen Proportionalität gegenüber der Wurzel aus der Chloratkonzentration ergeben.

I. Nachweis des „normalen" Methämoglobins mittels der Chloratreaktion.

a) Theorie.

1. Aus den Untersuchungen von HEUBNER und JUNG ergibt sich für die Beziehung zwischen Ausgangskonzentration des Methämoglobins ($[\underset{t=o}{Hb(3)}]$), laufender Methämoglobinkonzentration ($[Hb(3)]$) und der jeweiligen Versuchsdauer t bei Zugabe von Kaliumchlorat im Überschuß eine sehr einfache Beziehung

$$[Hb(3)] = [\underset{t=o}{Hb(3)}]\, 10^{\frac{kt}{2{,}30}} \qquad (1)$$

welche sich experimentell leicht reproduzieren läßt und auch von KIESE bestätigt wurde. Katalase (JUNG) und Cytochrom (KIESE[3]) besitzen keine katalytische Wirkung, Metamyoglobin nur ¼ der Wirkung des $Hb(3)$. Trägt man somit den Logarithmus der $[Hb(3)]$ gegen t auf, so erhält man eine gerade Linie, welche die Ordinate O im gesuchten $[\underset{t=o}{Hb(3)}]$ schneidet.

2. Da im Augenblick der Hämolyse die von BROOKS[4] eingehend studierte Spontanoxydation des Hämoglobins einsetzt, sind die tatsächlichen Verhältnisse verwickelt. Für die gesamte Bildung von $Hb(3)$ gilt

$$\frac{d[Hb(3)]}{dt} = k\,[Hb(3)] + m\,([Hb] - [Hb(3)]), \quad [Hb] = \text{Gesamtkonzentration an Blutfarbstoff} \qquad (2)$$

wobei das erste Glied die $Hb(3)$-Bildung durch Chlorat, das zweite die Spontanoxydation entsprechend den Befunden von Brooks darstellt. Durch Integration wird aus (2) nach Berechnung der Integrationskonstante aus den Werten für den Zeitpunkt $t = o$:

$$t = \frac{2{,}30}{k - m} \log \frac{m\,[Hb] + (k - m)\,[Hb(3)]}{m\,[Hb] + (k - m)\,\underset{t=o}{[Hb(3)]}}, \tag{3}$$

bzw. umgeformt:

$$[Hb(3)] = \frac{1}{k - m}\left\{10^{\frac{(k-m)\,t}{2{,}30}}\left(m\,[Hb] + (k - m)\,\underset{t=o}{[Hb(3)]}\right) - m\,[Hb]\right\} \tag{4}$$

Unter den üblichen Versuchsbedingungen ist k wenigstens 100 mal größer als m. Damit vereinfacht sich (4) zu

$$[Hb(3)] = \left(\underset{t=o}{[Hb(3)]} + \frac{m}{k}\,[Hb]\right) 10^{\frac{kt}{2{,}3}} - \frac{m}{k}\,[Hb] \tag{5}$$

Für höhere $[Hb(3)]$-Werte, d. h. über 5% des Hb kann der Subtrahend vernachlässigt werden, da er unter 1% des Hb liegt und bei Werten von $[Hb(3)]$ über 10% für Extrapolation usw. praktisch nicht mehr ins Gewicht fällt, bei geringeren Konzentrationen (5—10% $Hb(3)$) nur geringfügige Korrekturen bedeutet. Zwischen 5 und 40%, d. h. in dem Konzentrationsgebiet, in welchem unsere Messungen vorgenommen werden, trifft daher wieder die lineare Abhängigkeit zwischen $log\,[Hb(3)]$ und t zu. Für höhere Anfangskonzentrationen $\underset{t=o}{[Hb(3)]}$ kann auch der Summand $\frac{m}{k}\,Hb$ vernachlässigt werden, jedoch nicht generell. Wird $\frac{m}{k}\,Hb$ kommensurabel mit $\underset{t=o}{[Hb(3)]}$, so stellt sich eine Abhängigkeit des durch Extrapolation erhaltenen fiktiven Ausgangswertes „$\underset{t=o}{[Hb(3)]}$" von der durch Variation der Chloratkonzentration leicht zu verändernden Konstanten k ein. Das Ausmaß dieser Variation ist ein Maß für die Konstante m, bzw. für den Einfluß der Spontanoxydation. Durch Messung des Reaktionsverlaufs bei verschiedener Chloratkonzentration läßt sich somit leicht m, damit $\frac{m}{k}\,Hb$ und die wirkliche $\underset{t=o}{[Hb(3)]}$ ermitteln.

b) Versuchsergebnisse.

Die Blutproben wurden schnell serumfrei zentrifugiert, die Zellen sofort anschließend im Wasserbad hämolysiert und die benötigte Menge Chlorat zugegeben. Das Volumen des Versuchsansatzes betrug 25 cm³, p_H 6,9 und die Chloratkonzentration meist 1%. Die Hb(3)-Konzentration (in % des [Hb]) in den einzelnen Proben wurde nach der früher von uns angegebenen Methode bestimmt. Die Hb(3)-bildung wurde nach Entnahme der Probe durch sofortiges starkes Verdünnen unterbrochen. Die Abb. gibt einen Versuch wieder.

Die Auswertung der Versuche wurde sowohl graphisch wie rechnerisch vorgenommen. Da meist mehrere Chloratkonzentrationen angewandt wurden, mußte zur Erleichterung der Extrapolation die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Chloratkonzentration bestimmt werden. Die Durchführung soll für den abgebildeten Versuch gezeigt werden:

Auswertungsbeispiel:

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der Einzelbestimmungen noch einmal zusammengestellt.

Tabelle 1.

	IV		III		II		I	
t	%	lg	%	lg	%	lg	%	lg
0	—	—	—	—	—	—	—	—
8	4	0,6						
13	10	1,0						
17	20	1,3	9	0,95				
22	32	1,5	14	1,15				
25	43	1,63	—	—				
28,5	54	1,73	25	1,40	11	1,04		
33,5	Ende		35	1,54	16	1,2		
39,5			44	1,64	23	1,36	9	0,95
45			Ende		29	1,46	—	—
51					33	1,52	14	1,15
59					43	1,63	21	1,32
65,5					Ende		27	1,43
70,5							30	1,48
77							35	1,55
87							45	1,66

a) Spalte 1 gibt die Reaktionszeit in Minuten, Spalte 2 den direkt bestimmten Gehalt an *Hb*(3) im Reaktionsansatz und Spalte 3 den Logarithmus dieses Prozentwertes und zwar jeweils für die schnellste Reaktion. Es folgen die übrigen Versuche, welche gleichzeitig durchgeführt wurden. Die *Hb*(3)-Bestimmungen wurden auf den

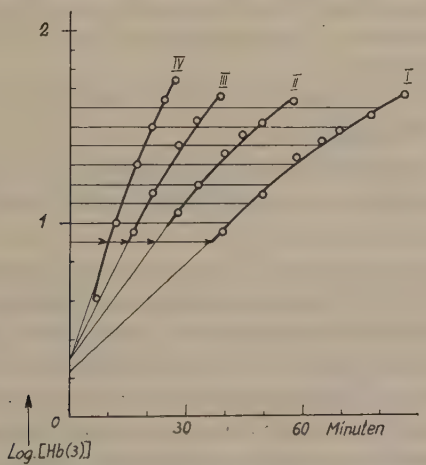


Abb. 1. Menschliche Blutkörperchen, hämolysiert. Chloratkonzentrationen I: 1/4%, II: 1/2%, III: 1% und IV: 2%. Temperatur 30°. Ordinate: neugebildetes Hb (3) (logarithmisch), in % des Gesamthämoglobins. Abszisse: Zeit in min. Ausgleichskurven dick (Verwendung aller Punkte). Extrapolation dünn. (nur Werte zwischen 10 u. etwa 50% verwertet, da übrige Versuchswerte wegen Nebenreaktionen usw. nicht für lineare Extrapolation geeignet; [Ausgleichskurve und Extrapolation daher nicht identisch]).

Konzentrationsbereich zwischen 5 und 50% beschränkt. Trotzdem ergab sich auch bei Verwendung der logarithmischen Skala keine Geradlinigkeit. Die Auswertung wird jedoch dadurch nicht beeinflußt. Anschließend wurde (Tab. 2) mit Hilfe von Ausgleichskurven für bestimmte festliegende *Hb*(3)-Konzentrationen die zugehörige Reaktionszeit bestimmt. Schließlich wurden diese Zeiten für jede *Hb*(3)-Konzentration in Prozenten der längsten Zeit (Reaktion I) angegeben und die Mittelwerte errechnet. Dabei ergab sich, daß jeweils bei Verdopplung der Chloratkonzentration die Reaktionszeit sich um den Faktor $100/65 = 1{,}54$ bzw. $65/44 = 1{,}48$ bzw. $44/30 = 1{,}47$ verkürzt. Diese Zahl (im Mittel 1,50) liegt dem theoretisch verständlichen Faktor $1{,}42 = \sqrt{2}$ nahe, kann aber nicht als Abweichung bzw. Fehler eines prinzipiellen Faktors 2 gedeutet werden.

Tabelle 2.

Log [Hb(3)]	t in min				t in % von t1			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0,9	35	(23)	16	10	100	65	45	29
1,0	42	26	18	13	100	62	43	31
1,1	47	30	21	14	100	64	44	30
1,2	52	34	23	15	100	65	44	29
1,3	58	38	26	17	100	65	45	29
1,4	65	43	29	20	100	66	45	31
1,5	73	48	33	22	100	67	46	31
1,6	82	55	37	25	100	67	45	30
			Mittelwerte		100	65	44	30

b) Die Durchführung der Extrapolation auf den Zeitpunkt 0 ist nunmehr einfach. Wie aus Abb. 1 auch entnommen werden kann, wurden dabei die sehr niederen, also unsicher bestimmten *Hb*(3)-Werte nicht sehr stark bewertet. Im allgemeinen war das Ergebnis bei linearer Extrapolation der zwischen 10 und 40% *Hb*(3) liegenden Meßpunkte befriedigend.

In insgesamt 12 Versuchen mit je 2—4 verschiedenen Chloratkonzentrationen ergab sich eindeutig:

1. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist nicht der Chloratkonzentration proportional, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit deren Quadratwurzel.

2. Die Extrapolation führte im Rahmen der Versuchsfehler zu übereinstimmenden Ergebnissen, insbesondere waren keine systematischen Abweichungen nachweisbar, welche auf einen Einfluß der Spontanoxydation hinweisen würden.

In Tab. 3 sind die Ergebnisse bei einer Reihe menschlicher Blutproben zusammengefaßt. Bemerkenswert scheint, daß sich gewisse individuelle Unterschiede abzeichnen, welche an verschiedenen Tagen für dieselbe Person reproduzierbar waren. Die Ergebnisse sind im Verhältnis zur kolorimetrischen Methode zu hoch. Da uns die Kinetik der Chloratreaktion noch ziemlich undurchsichtig ist, möchten wir sie auch nicht als absolute Zahlenwerte aufgefaßt wissen, sondern lediglich als weiteren

ziemlich schlüssigen Beleg für die Existenz von normalem Hb(3) im menschlichen Blut.

Tabelle 3.

	Name	Datum	Log [Hb(3)] t = o	[Hb(3)] t = o in %
1.	Jung	3. 8. 46	0,3	2,0
2.	Witt	3. 8. 46	0,25	1,8
3.	Kuon	2. 8. 46	0,2	1,6
4.	Jung	2. 8. 46	0,4	2,5
5.	Witt	24. 7. 46	0,2	1,5
6.	Jung	16. 7. 46	0,3	2,2
7.	Müller	16. 7. 46	0,2	1,6
8.	Kuon	15. 7. 46	0,1	1,3
9.	Jung	14. 7. 46	0,2	1,6
10.	Rüger	26. 7. 46	0,1	1,3
11.	Jung	27. 7. 46	0,4	2,5
12.	Kuon	29. 7. 46	0,1	1,3

Zu dieser einschränkenden Bemerkung wurden wir insbesondere durch eine folgende Versuchsserie geführt, in welcher wir die Umsetzungsgeschwindigkeit mit Chlorat in hämolysierten und intakten Zellen gegenüberstellten. Obwohl in früheren Untersuchungen gezeigt worden war, daß die Hämoglobinkonzentration den Ablauf der Chloratreaktion nicht wesentlich modifiziert, zeigte sich, daß innerhalb der Blutzellen die Reaktion mit größerer Geschwindigkeit läuft. Dies kann sowohl auf den besonderen Verhältnissen des Hämoglobins bzw. auch des *Hb*(3) innerhalb der Zelle wie auf anderen Milieubedingungen beruhen, könnte aber auch auf eine Beteiligung von Fermentsystemen der roten Blutzelle hinweisen.

II. Diskussion.

Die erneut festgestellte Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Wurzel aus der Chloratkonzentration läßt das Problem des katalytischen Chloratzerfalls recht kompliziert erscheinen. Besonderheiten dieser Reaktion, welche dieser eigentümlichen Konzentrationsabhängigkeit entsprechen, konnten übrigens auch bei näherem Studium der hemmenden Wirkung von F bzw. CNO-Ionen festgestellt werden.

Wir möchten das Ergebnis zunächst damit deuten, daß beim Zerfall des Chlorats — ähnlich wie auch bei anderen Häminkatalysen — mindestens 2 Fe-haltige Gruppen des Hämoglobins zusammenwirken. Ohne im einzelnen auf das Ergebnis laufender Versuche einzugehen, soll hier ferner daraufhingewiesen werden, daß eine aus unseren früheren Mitteilungen zu entnehmende Deutung des Chloratzerfalls am Hämiglobin kaum richtig sein dürfte, nämlich die wesentliche Beteiligung anderer Sauerstoffsäuren des Chlors als Zwischenstufen. Vermutlich treten diese zwar intermediär auf, aber erst nachdem durch den eigentlichen katalytischen Prozeß der — einem Zerfall der $HClO_3$ entgegenstehende — „Potentialberg“ überwunden ist. Insofern besteht zwischen den merk-

würdigen Zerfallsbedingungen des Chlorats und seiner im trockenen Zustand bemerkenswerten Neigung zum Spontanzerfall bei Energiezufuhr (Licht, Wärme, Stoß usw.) eine gewisse Analogie.

Zusammenfassung.

Das Vorkommen normalen Methämoglobins in den roten Blutkörperchen läßt sich mit Hilfe der Chloratreaktion bestätigen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung zwischen Chlorat und Hämoglobin ist mit großer Annäherung der Wurzel aus der Chloratkonzentration proportional.

Literatur.

[1] Heubner, W., u. F. Jung: Ver. dtsch. chem. Ges. **75**, 1636 (1942). — [2] Kiese, M., E. Savini u. W. Schwartzkopff: Biochem. Z. **317**, 32 (1944).

Prof. Dr. Fritz Jung, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 76.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 109—120 (1951).

Mitteilung aus dem Laboratorium für optische Meßinstrumente der Zeiß-Opton-Werke, Oberkochen.

Zur Methodik der flammenphotometrischen Bestimmung von Na, K und Ca im Blutserum.

Von

ADRIAN VON OER und HANS-JOACHIM HÖFERT.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Juli 1951.)

Bei der flammenphotometrischen Bestimmung von mehreren Elementen, die in der Analysenlösung nebeneinander enthalten sind, stören folgende Effekte:

a) Wegen der Fehldurchlässigkeit der zur Trennung der Emissionslinien benutzten Mittel (Filter oder Monochromator) tragen zum Photostrom des einen Elementes die anderen Elemente je nach der Konzentration noch einen Teil bei.

b) Die gleichzeitig in der Flamme angeregten Metallionen beeinflussen sich gegenseitig hinsichtlich der Emission.

BELKE und DIERKESMANN[1] haben für die Bestimmung von Na, K und Ca im Blutserum ein Verfahren angegeben, das diese Effekte berücksichtigt.

Danach wird zunächst die Na-Bestimmung durchgeführt, wobei reine Na-Lösungen als Eichlösungen verwendet werden. Sowohl die Fehldurchlässigkeit des Na-Filters, als auch die Beeinflussung der Na-Emission durch K und Ca können bei den im Blutserum herrschenden Konzentrationen vernachlässigt werden. Dann wird auf K analysiert, wobei die vorher bestimmte Na-Konzentration den Eichlösungen zugefügt wird. Schließlich wird analog dem bei K angewandten Verfahren das Ca bestimmt. Dabei müssen die Eichlösungen die gefundenen Konzentrationen von Na und K enthalten.

Diese Methode ist exakt, aber umständlich, da in jedem Fall die Eichlösungen verändert werden müssen. Im folgenden wird ein vereinfachtes Verfahren beschrieben. Für die laufenden Analysen sind nur zwei konstante Eichlösungen notwendig, wenn die Eichung der Apparatur einmal durchgeführt und in Diagrammen festgehalten ist.

1. Aufbau und Eigenschaften der Meßanordnung.

Die in Abb. 1 schematisch dargestellte Apparatur arbeitet nach dem Ausschlagsverfahren*. Im prinzipiellen Aufbau gleicht sie der Anord-

* Die Bezeichnung „Ausschlagsverfahren" ist hier gemeint im Unterschied zum Vergleichsverfahren, wie es bei der photographischen Spektrochemie üblich ist. Beim Vergleichsverfahren wird das Intensitätsverhältnis der Linien von zwei Elementen, nämlich des Analysenelementes und eines Vergleichselementes, als Meßgröße verwendet, während beim Ausschlagsverfahren die Intensität der Linie des Analysenelementes allein als Meßgröße dient.

nung von Belke und Dierkesmann und ebenso dem von Carl Zeiss, Jena, z. Zt. gebauten Flammen-Photometer.

Zerstäuber (vgl.[2, 3, 4]) und Brenner sind den von Belke und Dierkesmann benutzten weitgehend ähnlich. Die Form des Brenners ist ziemlich belanglos für die Sicherheit der Resultate. Die äußerlich sichtbare Ruhe der Flamme ist nur von untergeordneter Bedeutung für die zeitliche Konstanz der Emission. Als Filter wurden verwendet für die Na-Bestimmung (Liniendublett bei 5890/96Å) ein Interferenzfilter Schott, Jena, SIF 589b, für die K-Bestimmung (Liniendublett bei 7665/99 Å) ein Farbglas Schott RG 8 oder ein Interferenzfilter, für die

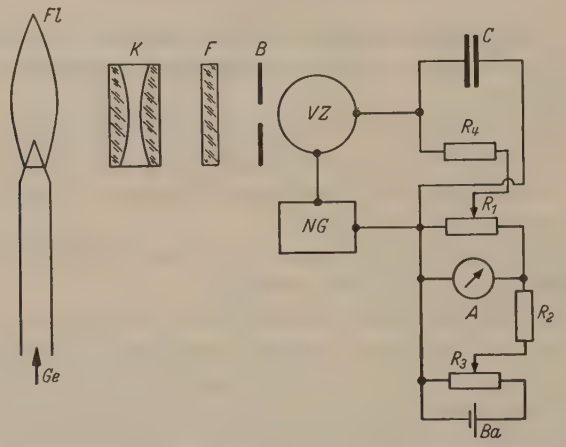


Abb. 1. Meßanordnung, schematisch. Ge Zufuhr des Nebel-, Luft-, Azetylen-Gemisches, Fl Flamme. K Kondensor, F Filter, B Blende, VZ Vervielfacher-Photozelle, NG Netzgerät zum Betrieb des Vervielfachers, A Galvanometer, C Kondensator, R_1-R_4 Widerstände, Ba Batterie.

Ca-Bestimmung (grüne Bande bei 5530 Å) ein aus Schott-Gläsern kombiniertes Filter. (Durchlässigkeitskurven der Filter vgl. Abb. 4).

Der mittlere Teil der Flamme, 10 mm oberhalb des blauen Kegels, wird durch einen Kondensor der Öffnungszahl 0,6 im Maßstab 1 : 1 abgebildet auf die Kathode des als Empfänger dienenden Elektronenvervielfachers (Type VpA 11 tp von Dr. G. Maurer, Neuffen. Maximale nutzbare Verstärkung etwa $5 \cdot 10^6$). Der Ausgangsstrom des Vervielfachers wird durch das Galvanometer A gemessen, dessen Empfindlichkeit am Widerstand R_1 geregelt werden kann, um den Ausschlag für eine Standard-Lösung auf einen bestimmten Wert zu bringen. Die Schaltglieder C und R_4 dienen zur Einstellung einer erhöhten Zeitkonstanten der Anzeige. Mit Hilfe der Batterie Ba und der Widerstände R_2 und R_3 kann der „Leerwert", d. h. der Ausschlag bei der Zerstäubung von destilliertem Wasser, auf Null kompensiert werden.

Für die in gewissen Grenzen frei wählbaren Betriebsdrucke von Preßluft und Azetylen kann man günstigste Werte finden, wenn man die Abhängigkeit der Intensität der Analysenlinien von den Gasdrucken experimentell bestimmt. Abb. 2 zeigt das Ergebnis solcher Messungen. Man wählt die normalen Betriebsdrucke so, daß die Intensität für alle Ana-

lysenelemente möglichst nahe bei den Maxima bzw. auf möglichst flachen Stücken der Kurven liegt. Man erreicht auf diese Weise, daß die Abhängigkeit der Emission von Schwankungen der Gasdrucke möglichst klein wird. Für die aus Abb. 2 für unsere Anordnung folgenden günstigsten Drucke von 0,3 atü Luft und 55 mm H_2O Azetylen wurde eine Konstanz der Emission aller drei Elemente innerhalb einer Schranke von $\pm$ 1% ohne besondere Maßnahmen erreicht.

Zur Na-Bestimmung wird das Serum im Verhältnis 1 : 100 verdünnt, so daß der mittlere Gehalt 30 mg/l*, die physiologischen Extremwerte etwa 28—35 mg/l betragen. Für die K- und Ca-Bestimmung wird das Serum im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Die mittleren Werte bzw. Extremwerte der Konzentration sind dann 20 bzw. 16 bis 24 mg/l K und 10 bzw. 5—15 mg/l Ca. Nach Belke und Dierkesmann sind bei diesen Verdünnungen die Einflüsse der übrigen Beimengungen (Eiweißstoffe usw.) sowie der Zähigkeit und Oberflächenspannung so gering, daß das Verfahren mit wäßrigen Lösungen geeicht werden kann.

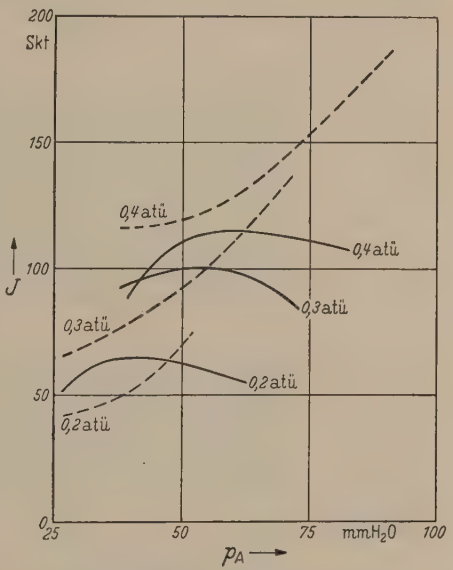


Abb. 2. Abhängigkeit des Photostromes von Azetylen- und Preßluftdruck. J Photostrom, normiert auf 100 für Azetylendruck 55 mm H_2O und Preßluftdruck 0,30 atü, das sind die normalen Betriebsbedingungen. p_A Azetylendruck in mm H_2O. Parameter: Preßluftdruck in atü. Lösungen: 30 mg/l Na (ausgezogene Kurven) bzw. 20 mg/l K (gestrichelte Kurven).

Die Empfindlichkeit der Anordnung ist wegen der hohen nutzbaren Verstärkung des Vervielfachers nicht mehr bestimmt durch die Ausschlagsempfindlichkeit des Meßinstrumentes, sondern durch die zeitliche Schwankung des Leerwertes, die etwa 1% beträgt. Für die Grenzempfindlichkeit, definiert als diejenige Konzentration, bei welcher der zugeordnete Photostrom der mittleren Schwankung des Leerwertes gleich ist, ergeben sich folgende Werte:

Na: $1 \cdot 10^{-2}$ mg/l
K: $2 \cdot 10^{-2}$ mg/l
Ca: $2 \cdot 10^{-1}$ mg/l

* Die in der medizinischen Literatur oft benutzte Angabe der Konzentration in „mg%" ist mißverständlich. Da bei der Analyse alle Lösungen nach Volumen abgemessen werden, muß eine korrekte Angabe der Konzentration in Gewicht der Substanz pro Volumen-Einheit der Lösung erfolgen, also in Einheiten g/l oder Untereinheiten davon.

Die Genauigkeit der flammenphotometrischen Ausschlagsmethode ist ebenfalls begrenzt durch die Schwankungen der Zerstäubung. Die kurz dauernden Schwankungen, deren Periode von der Größenordnung einer Sekunde oder kleiner ist, können teilweise ausintegriert werden, indem man die Zeitkonstante der Meßvorrichtung genügend groß macht. Diesem Zweck dient die Kombination C, R_4 in der Meßanordnung. Abb. 3 zeigt zwei Registrierungen des zeitlichen Verlaufs des Photostromes, die mit zwei verschiedenen Werten der Zeitkonstante aufgenommen wurden. Die mittlere Schwankung des Stromes beträgt 1,4% bei der kleineren und 0,6% bei der größeren Zeitkonstante. Die Werte der Schwankung sind in weiten Grenzen unabhängig von der äußeren Ruhe der Flamme.

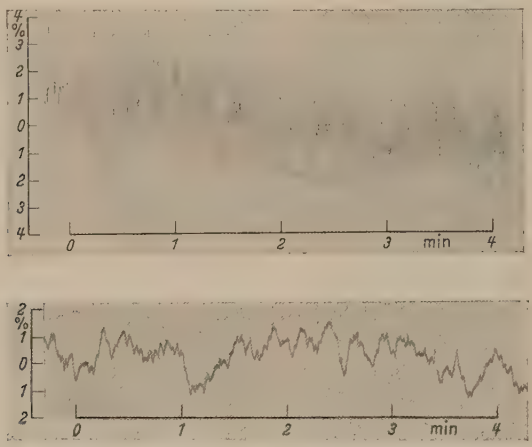


Abb. 3. *Zeitlicher Verlauf des Photostromes* bei verschiedenen Zeitkonstanten des Meßkreises Ordinatenskala: Abweichung in % vom zeitlichen Mittelwert.
Obere Kurve: $C = R_4 = 0$, Galvanometer aperiodisch gedämpft, Zeitkonstante ca. 0,6 sec. Untere Kurve: $R_4 = 0{,}4$ MΩ, $C = 12$ μF, Zeitkonstante 4,8 sec.

Die Ursache der Schwankungen liegt nach unseren Erfahrungen hauptsächlich in der Unregelmäßigkeit der Zerstäubung, die auch bei völlig konstantem Preßluftdruck auftritt. Es zeigte sich, daß langsame Änderungen der Flammenemission in Zusammenhang stehen mit der Bildung von Tropfen oder Wasserhäuten an den Wänden der Leitungen zwischen Zerstäuber und Brenner. Durch Bildung von Flüssigkeitsansammlungen in den Leitungen wird offensichtlich die Menge oder der Dispersitätszustand des der Flamme zugeführten Nebels beeinflußt. Zu diesen Beobachtungen stimmen auch die Ergebnisse von Weichselbaum und Varney[5], die eine bessere Reproduzierbarkeit der Messungen erhielten, wenn der Nebel unmittelbar in die Flamme eingeblasen wurde.

Die Verbesserung der Sicherheit in der Ablesung durch Vergrößerung der Zeitkonstanten hat ihre Grenzen. Die Zeit, nach der der Ausschlag des Strommessers 99% seines Endwertes erreicht hat, beträgt für einen Wert der Zeitkonstanten von 5 sec schon 23 sec; die während dieser Zeit vom Zerstäuber verbrauchte Flüssigkeitsmenge beträgt bei unserem

Zerstäuber etwa 5 cm³. Um die Zeit zwischen Zerstäubungsbeginn und Ablesung des Meßwertes und ebenso um den Flüssigkeitsbedarf nicht zu groß werden zu lassen, wird man demnach mit dem Wert der Zeitkonstanten nicht wesentlich über 5 sec hinausgehen können. Wechselt man aber, wie es im praktischen Analysengang geschieht, etwa alle 30 sec die Lösung, so wird die Fehlergrenze für die einzelne Konzentrationsbestimmung größer als der Wert von 0,6%, der sich bei Zerstäubung einer einzelnen Lösung über lange Zeit (10 min) nach Abb. 3 ergibt. Wir haben z. B. den mittleren Fehler der Konzentrationsbestimmung einer einzelnen Lösung ermittelt, wobei diese Lösung in regelmäßigem Wechsel mit destilliertem Wasser jeweils 1 min lang zerstäubt wurde. Es ergab sich ein mittlerer Fehler von 1,5%. Bei diesen und weiteren, an einer Reihe verschiedener Lösungen durchgeführten Messungen wurde kein systematischer Fehler gefunden, etwa derart, daß die Messung einer Lösung beeinflußt würde von der Konzentration der vorher zerstäubten Lösung. Für die „Reinigung" des Zerstäubers von der vorhergegangenen Zerstäubung reicht bei Konzentrationen der Größenordnung 100 mg/l erfahrungsgemäß eine Zeit von etwa 20 sec aus.

Für den die Genauigkeit der Methode im eigentlichen Sinne bestimmenden Fehler der vollständigen Analyse, wie er sich aus der Bestimmung von Proben bekannten Gehaltes ergibt, wurden bei unserer Anordnung Werte von 2—3% gefunden. Auch Barnes und Mitarbeiter[6] geben für das Ausschlagsverfahren einen mittleren Fehler von 3% an. Durch Anwendung der Vergleichsmethode kann man die Unsicherheitsgrenzen herabsetzen, wie Berry und Mitarbeiter[7] gezeigt haben*. Wir haben uns jedoch zunächst auf das Ausschlagsverfahren beschränkt, das seiner größeren Einfachheit halber bis jetzt in den meisten Fällen angewendet wurde.

2. Güte der Filter und gegenseitige Beeinflussung der Elemente.

Zur Orientierung über die Möglichkeit einer Vereinfachung der Analysenmethode müssen die beiden eingangs beschriebenen Effekte, die eine strenge Selektion der einzelnen Bestimmungen stören, quantitativ diskutiert werden.

2. 1. *Die Eigenschaften der Filter* sind aus den spektralphotometrisch gemessenen Durchlässigkeitskurven (Abb. 4) zu ersehen. Die Maximaldurchlässigkeiten sind vom Betrage 0,3 oder größer, die Fehldurchlässigkeiten vom Betrage $3 \cdot 10^{-4}$ oder kleiner, mit Ausnahme der relativ großen Fehldurchlässigkeit des Na-Filters für die gelbe Ca-Bande zwischen 6000 und 6500 Å. Infolgedessen sind die Filter hinsichtlich ihrer Güte durchaus vergleichbar mit einem Monochromator.

* Nach der Vergleichsmethode arbeitet z. B. das Flammen-Photometer der Perkin Elmer Corp., Glenbrock, Conn. USA.

Bei Monochromatoren mit einfacher Zerlegung ist die Maximaldurchlässigkeit meist nicht größer als 0,3 bis 0,5, die Fehldurchlässigkeit infolge des Streulichtes von der Größenordnung 10^{-4}. In bezug auf den ausnutzbaren Lichtstrom sind die Filter einem Monochromator weit überlegen. Die Verwendung eines komplizierten Monochromators anstelle der billigen Filter wäre also für die vorliegende Aufgabe völlig verfehlt. Bei anderen Aufgaben kann der Vergleich natürlich zugunsten des Monochromators ausfallen.

Tab. 1 gibt an, welche Beiträge die Mischungspartner infolge der Fehldurchlässigkeit der Filter zum Gesamtphotostrom liefern. Dabei ist

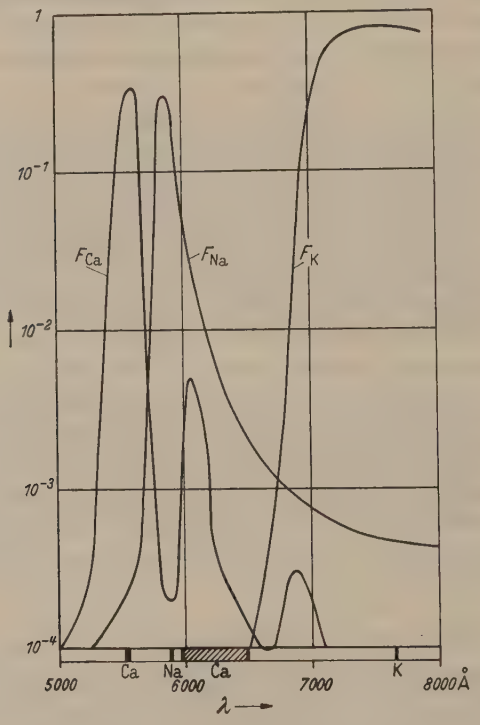


Abb. 4.
Spektrale Durchlässigkeit der Filter. F_{Na}, F_K, F_{Ca} Filter für Na- bzw. K- bzw. Ca- Bestimmung. An der Abszisse sind angedeutet die Emissionslinien von Na und K bzw. die Banden von Ca.

die mittlere Konzentration der drei Metalle in den normalen Serumverdünnungen zugrundegelegt. Wegen der relativ hohen Na-Konzentration fällt der Anteil des Na-Lichtes bei der Ca-Bestimmung noch ins Gewicht, obwohl die Durchlässigkeit des Ca-Filters an der Stelle der Na-Linie klein ist. Den Fehler, der dadurch in der praktischen Analyse entstehen würde, schaltet man aus, indem man die Na-Bestimmungen zuerst ausführt und die gefundene Konzentration bei der Bestimmung von Ca berücksichtigt.

Tabelle 1.

	Na		K		Ca	
	Konz. mg/l	Anteil %	Konz. mg/l	Anteil %	Konz. mg/l	Anteil %
Na-Filter . . .	30	99,8	2	0,01	1	0,15
K-Filter	300	0,01	20	99,3	10	0,5
Ca-Filter . . .	300	19	20	0,2	10	80,8

2. 2. *Die gegenseitige Beeinflussung* der Elemente in der Flamme ist schon mehrfach untersucht worden, vgl. [1, 5, 7, 8, 9, 10]. Da die Ergebnisse dieser Arbeiten stark voneinander abweichen, haben wir für unsere Apparatur die gegenseitige Beeinflussung noch einmal gemessen.

Dabei haben wir uns in der Hauptsache beschränkt auf die in den Serumverdünnungen vorliegenden Konzentrationsbereiche. Nur die Konzentration des beeinflussenden Elementes wurde in weiteren Grenzen variiert, um den Gang der Beeinflussung sichtbar zu machen.

Als Maß der Beeinflussung wurde die relative prozentuale Änderung des Photostromes, die durch Zugabe des beeinflussenden Elementes hervorgerufen wird, gewählt. Bezeichnet J_a den Photostrom für das Element a, dessen Beeinflussung durch das Element b untersucht werden sollte, ferner J_{a+b} den Photostrom für die Mischung beider Partner, so ist der Zahlenwert der Beeinflussung

$$B = \frac{J_{a+b} - J_a}{J_a} \cdot 100.$$

Die Fehldurchlässigkeit der Filter wurde durch Differenzbildung eliminiert, indem sowohl die Mischung der Elemente a und b als auch die reine Lösung b durch das zu a gehörige Filter photometriert wurden und die Differenz dieser Werte als J_{a+b} eingesetzt wurde.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 2 angegeben. Sie können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

a) Mischung von zwei Komponenten. Die Beeinflussung von Na durch K oder Ca kann innerhalb der im Serum vorkommenden Konzentrationsbereiche vernachlässigt werden. Dieser Befund stimmt mit der Beobachtung der anderen Autoren mit Ausnahme von Berry[7] überein. Die Beeinflussung von K durch Na ist beträchtlich. Im Konzentrationsbereich der Serumverdünnungen würde eine Nichtachtung dieser Beeinflussung Fehler von 20—30% der K-Bestimmung hervorrufen. Diese Resultate werden durch die anderen Arbeiten mindestens qualitativ bestätigt. Ca wird durch Na nicht merklich beeinflußt, wie auch Belke und Dierkesmann festgestellt haben. Allerdings sind in diesem Fall die Fehlergrenzen relativ groß, da die durch Fehldurchlässigkeit des Filters bewirkten Anteile am Photostrom, die subtrahiert werden müssen, beträchtlich sind. Für die Beeinflussung des Ca durch K haben wir einen positiven Effekt gefunden im Unterschied zu Belke und Dierkesmann und Riehm[10]. Für die Serumanalyse ist diese Beeinflussung jedoch ohne Belang, da sie in Gegenwart von Na nicht auftritt.

Tabelle 2. *Gegenseitige Beeinflussung der Emission.*

Als Maß der Beeinflussung ist angegeben der Wert

$$B = \frac{J_{a+b} - J_a}{J_a} \cdot 100.$$

J_a = Photostrom für Element a allein.

J_{a+b} = „ „ Mischung der Elemente a und b

Der mittlere Fehler der Meßwerte für B beträgt etwa 1,5 Einheiten der angegebenen Zahlen.

Untersuchtes Element (a)	Konz. mg/l	Beeinflussung durch: Element (b)	Konz. mg/l	B %	Element (b)	Konz. mg/l	B %
Na	30	K	2	0	Ca	1	0
			10	+ 0,5		10	— 1
			100	+ 4,0		100	— 2,5
			200	+ 7,5		200	— 3,5
K	10	Na	100	+ 47			
			300	+ 80			
			1000	+127			
K	20	Na	100	+ 19	Ca	10	0
			300	+ 41		20	0
			1000	+ 74			
Ca	10	Na	150	+ 1	K	20	+ 5,0
			300	+ 1		40	+ 6,0
			450	— 1,5			
Ca	15					20	+ 4,0
						40	+ 4,5
Ca	10				K	20	+ 0,5
					+Na	300	
	15				K	20	— 1,0
					+Na	300	

b) Mischung von drei Komponenten. Sind alle drei Metalle in der Lösung enthalten, so ändern sich die Verhältnisse der gegenseitigen Beeinflussung nicht wesentlich. K und Ca üben auch gemeinsam auf Na keinen meßbaren Einfluß aus. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, das Serum zunächst auf Na zu analysieren, ohne daß die Konzentration von K und Ca berücksichtigt zu werden braucht. Die stark positive Beeinflussung des K durch Na wird durch die Gegenwart von Ca nicht verändert. Ca wird im ternären Gemisch weder von Na noch von K merklich beeinflußt, das heißt, die im binären Gemisch Ca—K vorhandene schwache Beeinflussung des Ca durch K wird durch die Gegenwart von Na aufgehoben, vergl. Tab. 2.

Für die Praxis der Serumanalyse ergibt sich damit:

Für die Na-Bestimmung braucht der K- und Ca-Gehalt nicht bekannt zu sein. Na wird also zuerst bestimmt. Dann folgt die K-Bestimmung, wobei wegen der Beeinflussung des K durch Na die Konzentration des letzteren berücksichtigt werden muß. Schließlich wird auf Ca analysiert, wobei wegen der Fehldurchlässigkeit des Ca-Filters die Na-Konzentration ebenfalls berücksichtigt werden muß.

3. Eichung.

Nimmt man Eichkurven, d. h. den Zusammenhang zwischen Photostrom und Konzentration der Analysenelemente, an wäßrigen Lösungen auf, die alle drei Elemente enthalten, so wird die Fehldurchlässigkeit der

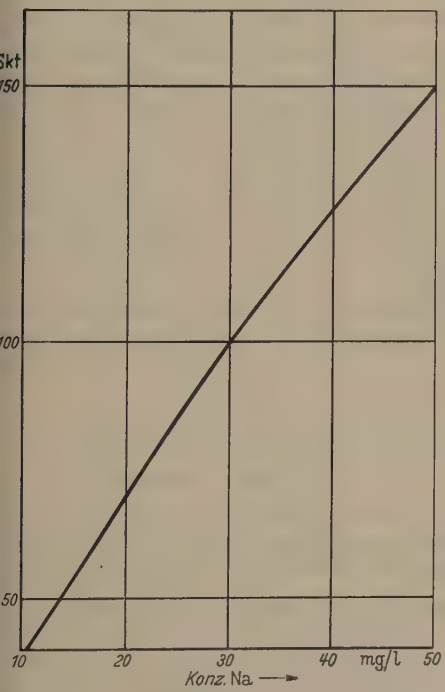


Abb. 5.

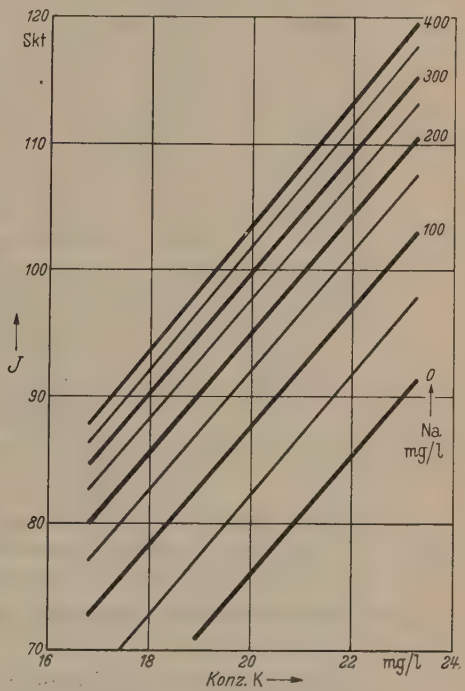


Abb. 6.

Abb. 5. *Eichkurve für die Na-Bestimmung.* Photostrom für Standardlösung 1 gleich 100 gesetzt.

Abb. 6. *Eichkurven für die K-Bestimmung.* Konzentration des Na als Parameter. Photostrom für Standardlösung 2 gleich 100 gesetzt.

Filter und die gegenseitige Beeinflussung der Elemente dabei von selbst berücksichtigt. Man muß lediglich die Konzentration der Begleitelemente als Parameter einführen. Solche für unsere Apparatur gültigen Eichdiagramme sind in Abb. 5, 6 und 7 dargestellt. Entsprechend den unter 2. mitgeteilten Daten bleibt Na unbeeinflußt, während in den Eichkurven

für K und Ca die Na-Konzentration als Parameter erscheint. Alle Kurven sind so normiert, daß Standardlösungen den Photostrom 100 Skalenteile ergeben. Diese Standardlösungen enthalten die mittleren in den Serumverdünnungen vorkommenden Konzentrationen. Entsprechend den beiden Serumverdünnungen 1 : 10 bzw. 1 : 100 sind zwei Standardlösungen mit folgenden Gehalten erforderlich:

Standardlösung 1 : 30 mg/l Na
2 : 300 mg/l Na + 20 mg/l K + 10 mg/l Ca.

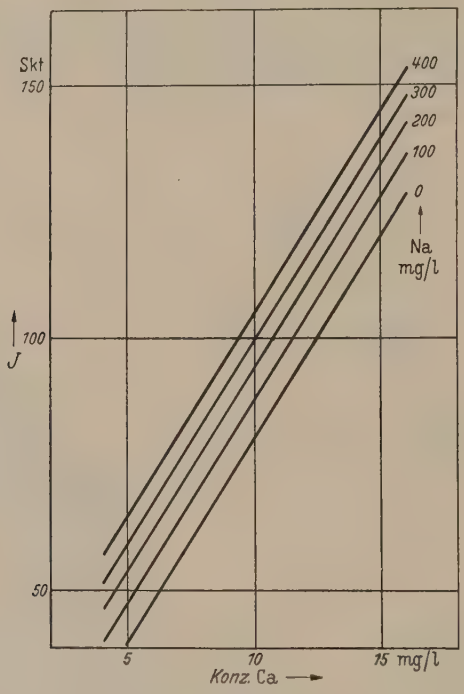


Abb. 7. *Eichkurven für die Ca-Bestimmung.* Konzentration des Na als Parameter. Photostrom für Standardlösung 2 gleich 100 gesetzt.

Lösung 1 dient zur Eichung der Na-Bestimmung, Lösung 2 zur Eichung der K- und der Ca-Bestimmung. Die Zugabe von K und Ca zur Lösung 1 erübrigt sich, da eine merkliche Beeinflussung des Na nicht auftritt.

Die Eichkurven wurden aus den Mittelwerten mehrerer Messungen an einer Reihe von Lösungen abgestufter Konzentration gewonnen. Die Lage der Kurven dürfte auf etwa 1% der mittleren Serumkonzentrationen sicher sein. Für K und Ca ist nur der für Serumanalysen interessierende Konzentrationsbereich dargestellt.

Für andere Filter und Photozellen sowie für andere Konzentrationsbereiche (Urin-Untersuchung), müssen entsprechende Eichkurven aufgenommen werden.

Wichtig ist bei der Auswahl der Filter, daß die Fehldurchlässigkeit des Na-Filters für K und Ca gering ist, damit die Na-Bestimmung ohne Berücksichtigung von K und Ca erfolgen kann.

Die langsamen Änderungen der Zerstäuberwirksamkeit erfordern eine häufige Nacheichung der Apparatur. Es ist üblich, jeweils destilliertes Wasser, Analysenlösung und Eichlösung nacheinander zu zerstäuben, also jeder Messung eine Eichung anzuschließen. Für diese Nacheichung genügt die Bestimmung einer einzigen Standardlösung. Das ist trivial für lineare Eichkurven, gilt aber auch für gekrümmte, über größere Konzentrationsbereiche erstreckte Eichkurven. Sind diese für eine Apparatur einmal aufgenommen, so genügt für die Nacheichung die Festlegung eines einzigen Punktes und die proportionale Umrechnung aller anderen Werte. Diese Vereinfachung ergibt sich als Resultat aus Versuchen über die Abhängigkeit der Gestalt gekrümmter Eichkurven von den Betriebsdrucken der Preßluft und des Azetylens und von zeitlichen Änderungen der Zerstäubung. Es zeigte sich, daß man die Drucke in ziemlich weiten Grenzen, bei unserer Apparatur z. B. zwischen 0,25 und 0,35 atü Preßluft und 45—65 mm H_2O Azetylen, ändern kann, ohne daß sich die Gestalt der Eichkurven ändert. Auch die zeitlichen Schwankungen der Zerstäuberwirksamkeit sind ohne merklichen Einfluß auf die Krümmung der Eichkurven.

Daraus ergibt sich die für die laufenden Analysenarbeiten wichtige Vereinfachung, daß die bei jeder Bestimmung notwendige Nacheichung nur mit einer einzigen konstanten Lösung vollzogen werden kann.

4. Analysengang.

Der Gang der Serumanalyse sei in Form einer Arbeitsvorschrift noch einmal zusammengestellt.

a) *Na-Bestimmung.* Man bestimmt unter Verwendung des Na-Filters unmittelbar nacheinander den Leerwert L_1 durch Zerstäuben von destilliertem Wasser, den Eichwert E_1 der Standardlösung 1 und den Analysenwert A_1 der Serumverdünnung 1 : 100. Mit dem Wert $100 \cdot \frac{A_1 - L_1}{E_1 - L_1}$ geht man in die Eichkurve Abb. 5 ein und entnimmt die gesuchte Konzentration.

b) *K-Bestimmung.* Mit dem K-Filter werden die analogen Messungen des Leerwertes L_2, des Eichwertes E_2 der Standardlösung 2 und des Analysenwertes A_2 der Serumverdünnung 1 : 10 gemacht. Mit dem Wert $100 \cdot \frac{A_2 - L_2}{E_2 - L_2}$ geht man in diejenige Kurve des Eichdiagramms von Abb. 6 ein, die dem 10fachen Wert der unter a) bestimmten Na-Konzentration entspricht.

c) *Ca-Bestimmung.* Diese erfolgt analog der K-Bestimmung unter Verwendung derselben Standardlösung.

Wenn die in Abb. 1 skizzierte Einrichtung zur Empfindlichkeitsänderung des Strommessers und zur Kompensation des Leerwertes zur Verfügung steht, wird die

Auswertung einfacher, da dann die Leerwerte L zu Null und die Eichwerte E zu 100 gemacht werden, so daß man mit den Meßwerten A unmittelbar in die Eichkurven eingehen kann.

Zur Prüfung der Genauigkeit des Verfahrens wurden wäßrige Lösungen bekannten Gehaltes an Na, K und Ca nach dem dargestellten Schema analysiert. Die Abweichungen zwischen den gefundenen und den bekannten Konzentrationen betrugen im Mittel etwa 2% vom Gehalt. Den Hauptanteil zu dieser Genauigkeitsschranke liefern die zufälligen Fehler infolge der Zerstäubungsschwankungen.

Zusammenfassung.

Für die flammenphotometrische Bestimmung von Na, K und Ca im Blutserum wird die Überlagerung der Einzelmeßwerte, hervorgerufen durch Filterfehldurchlässigkeit und gegenseitige Beeinflussung der Elemente, gemessen und diskutiert. Für die Auswertung der Messungen wird ein einfaches Verfahren beschrieben, das mit zwei Eichlösungen auskommt, wenn die Gesamteichung der Apparatur einmal durchgeführt ist.

Literatur.

[1] Belke, J., u. A. Dierkesmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 629 (1948). — [2] Schuhknecht, W.: Angew. Chem. **50**, 299 (1937). — [3] Waibel, F.: Z. techn. Phys. **19**, 394 (1938). — [4] Rauterberg, E., u. E. Knippenberg: Bodenkunde und Pflanzenernährung **20**, 364 (1941). — [5] Weichselbaum, T. E., and P. L. Varney: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **71**, 570 (1949). — [6] Barnes, R. B., D. Richardson, J. W. Berry and R. L. Hood: Ind. Eng. Chem., Anal Ed. **17**, 605 (1945). [7] Berry, J. W., D. G. Chappell and R. B. Barnes: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **18**, 19 (1946). — [8] Hasler, A.: Beitrag zur Kenntnis der quantitativen Flammenspektroskopie, Dissertation der E. T. H. Zürich 1941. — [9] Klyne, W., Spectroch. Acta **4**, 64 (1950). — [10] Riehm, H., Z. anal. Chem. **128**, 249 (1948).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 121—123 (1952).

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. Berthold Mueller).

Eine Testflecken-Methode zur Bestimmung kleinster Arsenmengen im biologischen Material.

Von
P. Seifert und R. Brossmer.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Juni 1951.)

Im Laufe eingehender Untersuchungen über den physiologischen Arsengehalt des menschlichen Organismus, worüber wir zu gegebener Zeit im Zusammenhang berichten werden, haben wir eine Mikromethode zur Bestimmung kleinster Mengen von Arsen im Gewebe und Liquores ausgearbeitet, die erlaubt, die bereits physiologisch im Organismus vorkommenden Arsenmengen einwandfrei zu bestimmen. Es handelt sich dabei um eine Testfleckenmethode, die auf dem von Gutzeit[1] bereits 1879 angegebenen Prinzip der Reduktion einer Silbernitratlösung durch Arsenwasserstoff aufbaut. Während die Gutzeitsche Methode qualitativ nur im negativen Falle eindeutig bewertet werden kann, da eine positive Reaktion auch von Phosphorwasserstoff und vor allem von dem im Gewebe und Liquores ubiquitären Schwefelwasserstoff gegeben wird, ist die von uns ausgearbeitete Methode auf Arsen spezifisch. Lediglich Antimon, das aber im biologischen Material nicht vorkommt und sehr viel seltener als Arsen ist, kann, wie bei den meisten anderen Arsen-Bestimmungsmethoden, störend wirken. Bei der Gutzeit-Methode wird zuerst eine Gelbfärbung und beim Befeuchten mit Wasser eine Schwarzfärbung beobachtet.

Das Prinzip unserer Methode besteht darin, daß die mit Schwefelsäure unter Zusatz von rauchender Salpetersäure und H_2O_2 in einem Kjeldahl-Kölbchen gewonnene Veraschungslösung von 1—5 g Gewebe bzw. 1—5 cm^3 Blut oder Urin in Röhrchen A der Apparatur (Abb. 1) mit Zink zusammengebracht wird, wobei die H_2SO_4 auf eine optimale Konzentration gebracht wird. Zur Intensivierung der Wasserstoffentwicklung werden 2—3 Tropfen einer verdünnten $CuSO_4$-Lösung zugesetzt. Ist Arsen vorhanden, so bildet sich mit dem naszierenden Wasserstoff Arsenwasserstoff, der durch Erzeugung eines Unterdruckes in der mit Wasser gefüllten Mariotteschen Flasche D mit der einströmenden Luft weiter nach B transportiert wird, wo die Luft durch eine $CdSO_4$-Lösung von störendem H_2S, der fast in jeder Laboratoriumsatmosphäre in kleinen Mengen vorhanden ist, befreit wird. Danach passiert der Luftstrom C

zwei aufeinander eingeschliffene Glasflanschen nach Angaben Gettlers[2, 3], der solche erstmalig zur Bestimmung von CO im Blute und Blausäure in Gewebe verwendet hat (Abb. 2). Diese halten zwischen sich ein mit Silbernitrat getränktes Filtrierpapier. Letzteres wird bei Gegenwart von Arsen zu metallischem Silber reduziert. Nach einer bestimmten Zeit, während der die Luft in genau vorgeschriebener Bläschenzahl die Apparatur passiert, wird das Testpapier herausgenommen, in Fixierlösung — wie bei der Fotografie — von überschüssigem Silbernitrat befreit, mit Wasser gespült und getrocknet. Je nach der Menge des in dem Untersuchungsmaterial vorhandenen Arsen entsteht ein Fleck von lichtem Braun bis zu einem oberflächlich glänzenden tiefen Schwarz. Die Intensität des Flecks von der Größe des Flanschendurchmessers ist der Arsenmenge direkt proportional. Mit bekannten Arsenmengen kann man sich eine Reihe von Standardtestflecken herstellen, womit Flecken unbekannter Arsenmengen verglichen werden und der Arsengehalt sehr exakt bestimmt werden kann. Die Standardtestflecken sind praktisch unbegrenzt haltbar und brauchen nur einmal unter konstant zu haltenden Bedingungen gewonnen werden. 0,1 γ Arsen läßt sich noch absolut erkennen, das heißt, wenn man von 1 g Gewebe ausgeht, ein As-Gehalt von 0,00001 %, und bei Anwendung von 10 g Ausgangsmaterial sogar 0,000001 %. Das sind derartig minimale Mengen von As, daß es sich von selbst versteht, nur völlig As-freie Reagentien zu verwenden. Jedes erneuerte Reagens muß auf As-Freiheit geprüft werden.

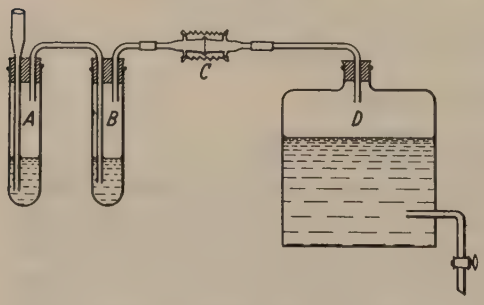


Abb. 1. Apparatur. A. Reagenzglas zur Aufnahme der Veraschungslösung. B. Waschgefäß mit Cd-Sulfat-Lösung. C. Glasflanschen. D. Mariottesche Flasche.

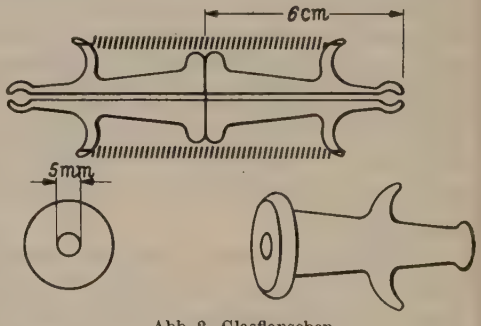


Abb. 2. Glasflanschen.

Erforderliche Reagenzien: 1. Rundfilter Schleicher & Schüll Nr. 1578; 2. 1%ige Lösg. von $AgNO_3$ p. a.; 3. 2,5%ige Lösg. von $Na_2S_2O_3$(Fixiersalz); 4. 10%ige $CdSO_4$-Lösg.; 5. 25%ige Lösg. von H_2SO_4 für forens. Zwecke; 6. Zn für forens. Zwecke; 7. 3%ige Lösg. von $CuSO_4$ p. a. Zum Veraschen außerdem konz. H_2SO_4, reine rauchende HNO_3 und 30%iges H_2O_2.

Genaue Vorschrift:

1. Veraschung. Die Veraschung erfolgt in einem 50 cm³ KJELDAHL-Kölbchen mit 2 cm³ konz. H_2SO_4 und etwa 20 cm³ rauchender HNO_3. Abdampfen der HNO_3, bis H_2SO_4-Dämpfe aufsteigen. Falls Lösg. klar bleibt, genügt 2maliges Abdampfen mit je 10 cm³ Wasser (zur Zerstörung der Nitrosylschwefelsäure) oder mit 5 cm³ H_2O_2. Endlösung: 2 cm³ konz. H_2SO_4-sauer.

2. Eigentliche Bestimmung. Flasche D wird mit Wasser gefüllt. In C wird ein Testpapier in der Größe des äußeren Flanschendurchmessers eingelegt, das mit 1—2 Tropfen der Lösung 2 aus einer Kapillaren befeuchtet wird (falls zu feucht, zwischen Filtrierpapier abpressen). B wird zu einem Viertel mit Glasperlen und 30 cm³ von Lösung 4 beschickt (braucht nur alle 3 Monate erneuert werden). In Reaktionsgefäß A werden dann 3 Zn-Granula eingefüllt und verschlossen. Nun wird ein aliquoter Teil der Veraschungslösung (0,5, 1,0 oder 2,0 cm³) mit Lösung 5 auf 12 cm³ aufgefüllt und nach Zusatz von 2—3 Tropfen der Lösung 4 durch den Einfülltrichter in A eingebracht. Sodann wird die Klemmschraube an D gelockert, so daß in 20 min etwa 0,4 l auslaufen. Nach dieser Zeit wird das Testpapier aus C entfernt, einige Minuten in Lösung 3 gebadet, anschließend in Wasser gewaschen, getrocknet und verglichen.

Es hat sich gezeigt, daß durch Erwärmen von A die Empfindlichkeit noch gesteigert werden kann. Das kann im einfachsten Falle so geschehen, daß A in ein zur Hälfte mit einmal kurz zum Sieden erhitztem Wasser gefülltes 100 cm³ fassendes Becherglas eingestellt wird.

Literatur.

[1] GUTZEIT, Pharmaz. Z. **24**, 263 (1879). — [2] GETTLER u. FREIMUTH: Amer. J. clin. Pathol. **13**. H., 9 (1943). — [3] GETTLER u. GOLDBAUM: Analytical. Chem. **19**, 270 (1947).

Dr. Dr. med. P. SEIFERT, Heidelberg,
Institut für gerichtliche Medizin der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 124—134 (1952).

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Vorstand: Professor Dr. Berthold Mueller).

Methanol und Widmark-Bestimmung.

Von
P. Seifert und H. Leyers.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Juli 1951.)

Die Widmark (W.)-Methode zur Bestimmung von Äthyl-Alkohol (Äth.-A.) ist eine unspezifische Methode. Sie läßt lediglich erkennen, ob im Blute reduzierende Substanzen vorliegen, die unter den Bedingungen der Methode aus dem Blute herausdestillieren und die Bichromat-Schwefelsäure in der Vorlage reduzieren. Da jedoch im normalen Blut nur minimale Mengen reduzierender flüchtiger Substanzen vorkommen, zeigt die Methode insofern trotzdem eine gewisse Spezifität für Äth.-A., wenn eine Azetonämie (Hunger, Diabetes) und eine vorangegangene Äthernarkose ausgeschlossen werden können. Die W.-Methode erlaubt demnach auch keine qualitative Differenzierung zu treffen zwischen Äth.- und Meth.-A., besser Methanol*. Daß jedoch quantitative Unterschiede in den W.-Werten, je nachdem ob Äth.-A., Meth. oder beide zusammen im Blute vorliegen, faßbar sind, wurde bereits von W. selbst und Bildsten (B.) gefunden.

In eingehenden Untersuchungen studierte B. 1924 das Verhalten des Meth. mit der W.-Methode. Er bestimmte die Bichromat-reduzierende Kraft zahlreicher Proben einer 1,0 und 0,73%igen Meth.-Lösung. Das Ergebnis dieser Arbeit war die Ermittlung eines Umrechnungsfaktors $k = 2{,}66$ bei Verwendung einer n/100 Na-Thiosulfatlösung (entsprechender W.-Faktor für Äth.-A. = 1,13). Zur Reduktion kam eine Bichromat-Schwefelsäure von 0,05 g auf 100 cm³ konzentrierter H_2SO_4 zur Anwendung. Die Dauer der Belassung der Proben bei 60° C betrug wie bei W. 2 Std. 2,66 γ Meth. entsprechen nach dieser Konstanten von B. demnach einem Na-Thiosulfat-Titrationswert von 0,01 cm³ einer n/100 Na-Thiosulfatlösung. Dem gleichen Titrationswert kommt nach W. eine Äth.-A.-Menge von 1,13 γ zu. Mithin wäre die Bichromat-reduzierende Kraft des Meth. wesentlich niedriger als die des Äth.-A. und zwar nur das 0,425 $\left(\frac{1{,}13}{2{,}66}\right)$ fache.

* Es liegt eine gewisse Tragik darin, daß sich der Ausdruck Methanol für Meth.-A. immer noch nicht allgemein durchgesetzt hat. Die vielen bisher bekanntgewordenen Unfälle durch Methanol dürften gerade auf dieser unglücklichen Bezeichnung *Methyl-„Alkohol"* beruhen.

In seiner Monographie „Die Methylalkoholvergiftung" hat Orthner (O.) 1950 insgesamt 103 Fälle von tödlichen Methanolvergiftungen einer eingehenden kritischen Betrachtung unterzogen. In 32 Fällen wurde Herzblut quantitativ nach Kolthoff-Deniges auf Meth. untersucht und gleichzeitig mit den W.-Werten, d. h. unter der Annahme, als handle es sich um Äth.-A., verglichen. Die Zusammenstellung O.s zeigt eindeutig, daß in der Überzahl der registrierten Fälle der Anteil des Meth. an den W.-Werten nur außerordentlich gering sein kann.

In einem Falle ergab die quantitative Meth.-Bestimmung 181 mg%, während die W.-Bestimmung 289 mg% auf Äth.-A. berechnet ergab. Das in gleichem Falle beschlagnahmte Getränk enthielt aber 45 g% Meth., d. h., es dürfte sich um ein nur Meth.-haltiges Getränk gehandelt haben. Demnach hätte der Na-Thiosulfat-Wert mit dem Oxydationsfaktor für Meth. multipliziert nach B. eine Meth.-Menge von 681 mg% ergeben müssen. Bedeutend ungünstiger noch liegen die Verhältnisse in all den Fällen, wo nachweislich mehr als 48 Std vergangen waren, ehe der Tod eintrat. In dieser Zeit dürfte Äth.-A. kaum selbst noch im Blute vorhanden sein. In einem solchen Falle hatte 1 Mann 56 Std vor dem Tode keinen Alkohol mehr getrunken (er lag während dieser Zeit im Krankenhause). Das sichergestellte Getränk bestand aus fast reinem wasserverdünnten Meth. Äth.-A. war nur in Spuren vorhanden. In diesem Falle wurden im Herzblut 21 mg% Meth. gefunden, während nach W. unter Zuhilfenahme des B.-Faktors 289 mg% im Blute vorgelegen haben müßten, d. h. annähernd das 14fache.

Die Berücksichtigung des Faktors von B. macht demnach die von O. erhobenen Befunde noch unklarer. O. äußert auf Grund dieser Überlegungen berechtigte Zweifel an der Richtigkeit des von B. ermittelten Faktors. Der Autor gibt auch bereits einen Hinweis darauf, wie ein etwaiger Fehler bei den Untersuchungen B.s zustande gekommen sein könnte. Während als gesichert angesehen werden kann, daß der Äth.-A. bei der W.-Methode nach einer 2stündigen Erwärmung auf 60° vollkommen überdestilliert und vom Bichromat oxydiert wird, spricht O. die Vermutung aus, daß bei Meth., der im Organismus bekanntlich sehr viel langsamer umgesetzt wird, auch bei der W.-Best. sehr viel langsamer von Bichromat oxydiert wird, so daß also die Zeit von 2 Std bei Meth. zur vollständigen Oxydation unzureichend ist. Nach Magnus-Levy ist die Oxydation der höheren Alkohole — wahrscheinlich durch gleichzeitige Sprengung der C-Atom-Kette — begünstigt, während das nur 1 C-Atom enthaltende Meth., den ihm angebotenen O_2 viel träger bindet. O. schließt sich auf Grund seiner Untersuchungen der Meinung von Nicloux und Placet an, die 1912 bereits bei Meth. ein weit stärkeres Reduktionsvermögen gegenüber dem Äth.-A. feststellen konnten. Wenn dies zutreffen sollte, ergibt sich die weitere Frage, die von O. ebenfalls angedeutet wurde, nämlich inwieweit Meth.-haltige alkoholische Getränke einen höheren Blutalkohol vortäuschen können, eine Frage, die von weittragendem forensischen Interesse sein dürfte.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war: 1. Eine grundsätzliche Nachprüfung des B.schen Faktors unter Berücksichtigung der Befunde von O. vorzunehmen; 2. quantitative Untersuchungen darüber anzustellen, inwieweit Meth.-Zusätze in alkoholischen Getränken einen höheren Blutalkoholwert vortäuschen können und 3. deren praktische Bedeutung für die Beurteilung einer Alkoholintoxikation festzulegen.

Zur *Nachprüfung des Oxydationsfaktors für Meth.* hielten wir uns zunächst streng an die W.sche Methodik. Entsprechend der Definition Widmarks — der sich auch B. bediente — enthielt also die $2^0/_{00}$ige Meth.-Lösung in 100 cm^3 0,2 g Meth. Zur Untersuchung gelangten eine 2- und $3^0/_{00}$ige Lösung. Als Oxydationslösung wurde zunächst eine

Tabelle 1. *Reduktionsfaktoren von Methanol mit der* Widmark-*Methodik unter Verwendung von 0,1 g $K_2Cr_2O_7$ auf 100 H_2SO_4 und n/100 Na-Thiosulfat.*

Gewicht der Probe in mg		Methanolmenge in γ		Reduziertes Bichromat = ccm n/100 Na-Thiosulfat × 100		$k = \frac{\text{Methanol}}{\text{Bichromat}}$	
2 °/₀₀ig	3 °/₀₀ig	3 °/₀₀ig	2 °/₀₀ig	3 °/₀₀ig	2 °/₀₀ig	3 °/₀₀ig	2 °/₀₀ig
			1. Nach 2 Std bei 60° C.				
90	98	180	294	132	173	1,36	1,70
68	69	136	207	100	123	1,36	1,68
93	70	186	210	122	100	1,52	2,10
93	100	186	300	121	171	1,54	1,74
90	76	180	228	115	142	1,56	1,60
87	70	174	210	128	106	1,38	1,98
84	69	168	207	125	122	1,34	1,68
74	68	148	204	93	122	1,56	1,68
k_2 stdg. (im Mittel)				$2^0/_{00}$ig = 1,46		$3^0/_{00}$ig = 1,78	
			2. Nach 4 Std bei 60° C.				
66	70	132	210	139	172	0,94	1,22
66	72	132	216	137	175	0,94	1,22
86	72	172	216	168	177	1,02	1,22
86	69	172	207	170	154	1,00	1,34
71	63	142	189	144	117	0,98	1,62
73	70	146	210	143	154	1,02	1,36
73	77	146	231	143	172	1,02	1,38
73	86	146	258	143	184	1,02	1,34
k_4 stdg. (im Mittel)				$2^0/_{00}$ig = 0,98		$3^0/_{00}$ig = 1,34	
			3. Nach 6 Std bei 60° C.				
88	85	176	255	172	186	1,02	1,36
88	85	176	255	174	187	1,00	1,36
74	78	148	234	166	190	0,88	1,24
73	77	146	231	159	188	0,92	1,22
75	76	150	228	159	183	0,96	1,24
75	—	150	—	158	—	0,92	—
k_6 stdg. (im Mittel)				$2^0/_{00}$ig = 0,94		$3^0/_{00}$ig = 1,28	

solche von 0,1 g $K_2Cr_2O_7$ in 100 cm³ konzentrierter H_2SO_4, zur Titration eine n/200 $Na_2S_2O_3$-Lösung verwendet. Unter Berücksichtigung des von O. erwogenen Zeitfaktors wurden je 2 Proben von jeder Konzentration 2, 4 und 6 Std bei 60° im Brutschrank belassen. Aus den in Tab. 1 wiedergegebenen Werten wird deutlich, daß der errechnete Oxydationsfaktor (Meth./verbrauchtes Bichromat, stets berechnet auf n/100 Na-Thiosulfat) für eine $3^0/_{00}$ige Meth.-Lösung mit zunehmender Stundenzahl von 1,78 bei 2 über 1,34 bei 4 auf 1,28 bei 6 Std absinkt. Für die $2^0/_{00}$ige Lösung sind die entsprechenden Werte 1,46 bei 2, 0,98 bei 4 und 0,94 bei 6 Std. Mit zunehmender Belassung der Proben bei 60° sinkt demnach der Oxydationsfaktor um ein beträchtliches weiter ab. Wie aus den Befunden hervorgeht, ist der größte Sprung zwischen 2 und 4 Std gelegen, während zwischen 4 und 6 Std der weitere Abfall nur noch sehr gering ist. Daraus folgt, daß eine *vollständige Oxydation des Meth. nach der W.-Methode 5—6 Std erfordert.* Eine 6stündige Belassung der Proben bei 60° dürfte demnach optimal sein. Die von O. bereits gemachte Annahme, daß Meth. bei der W.Best. nach 2 Std nur erst zu einem Bruchteil oxydiert wird, konnte demnach von uns vollauf bestätigt werden.

Hieraus ergibt sich für die Praxis der Blutalkoholbestimmung eine wichtige Konsequenz. Hat man den berechtigten Verdacht, daß dem genossenen alkoholischen Getränk größere Mengen Meth. beigemengt waren, so beläßt man eine Kontrollprobe des zu untersuchenden Blutes über 6 Std bei 60°. Findet man keine Differenz gegenüber den Proben von 2 Std, so scheidet eine stärkere Meth.-Beimengung aus. Findet sich dagegen eine außerhalb der W.schen Fehlerbreite gelegene Differenz, so ist der Verdacht begründet, und eine Meth.-Best. nach Kolthoff-Deniges ist angezeigt.

Unsere bezüglich des Zeitfaktors angestellten Untersuchungen ergaben weiterhin die interessante Feststellung, daß bei der geringeren Konzentration von $2^0/_{00}$ Meth. ein niedrigerer Oxydationsfaktor resultierte, woraus ersichtlich wird, daß in diesem Falle relativ mehr Meth. oxydiert wurde. Dies stimmt auch mit dem Befund von O. überein, der bei geringeren Meth.-Konz. höhere W.-Werte fand. Die Tatsache, daß wir auch unter Zugrundelegung unserer bei 2stündiger Belassung der Proben bei 60° gefundenen Werte keine auch nur annähernde Übereinstimmung mit dem B.schen Faktor erhielten, führte zu der Annahme, der Konz. der $K_2Cr_2O_7$-H_2SO_4-Lösung eine mitentscheidende Rolle bei der vollständigen oxydativen Umsetzung des Meth. zuzuschreiben. B. war ja, wie bereits vorher erwähnt, von einer Lösung von nur 0,05 g $K_2Cr_2O_7$ auf 100 cm³ H_2SO_4 ausgegangen, während wir mit einer Lösung von 0,1 auf 100 unsere Untersuchungen begannen. Der Unterschied zwischen den Konstanten bei der 2- und $3^0/_{00}$igen Lösung ließ demnach

die Vermutung zu, daß die Umsetzung auch nach 6 Std noch nicht abgeschlossen sei, weil die absolute $K_2Cr_2O_7$-Menge noch nicht ausreichte, um der relativ großen Reduktionskraft des Meth. zu genügen.

In einer 2. Versuchsreihe gingen wir dazu über, bei sonst gleichen Versuchsbedingungen eine Oxydationslösung von 0,25 g $K_2Cr_2O_7$ auf 100 H_2SO_4 zu verwenden, von der je 1 cm³ vorgelegt wurde. Wir kamen so zu den Werten der Tab. 2. Ein weiteres Absinken der Konstanten von 1,11 über 0,89 auf 0,77 bzw. 1,08 über 0,77 auf 0,65 zeigt an, daß

Tabelle 2. *Reduktionsfaktoren von Methanol mit der* Widmark-*Methodik unter Verwendung von 0,25 g $K_2Cr_2O_7$ auf 100 H_2SO_4 und n/100 Na-Thiosulfat.*

Gewicht der Probe in mg		Methanol-Menge in γ		Reduziertes Bichromat = ccm n/100 Na-Thiosulfat × 100		$k = \frac{\text{Methanol}}{\text{Bichromat}}$	
2 ‰ig	3 ‰ig	2 ‰ig	3 ‰ig	2 ‰ig	3 ‰ig	2 ‰ig	3 ‰ig
				1. Nach 2 Std bei 60° C.			
70	89	140	267	122	245	1,15	1,09
74	90	148	270	123	237	1,20	1,12
75	70	150	210	133	184	1,10	1,12
77	70	154	210	180	175	1,16	1,20
78	64	156	192	161	167	1,92	1,15
81	64	162	192	163	173	0,99	1,10
81	87	162	261	171	239	0,95	1,09
—	87	—	261	—	232	—	1,13
k_2 stdg. (im Mittel)				2‰ig = 1,08		3‰ig = 1,11	
				2. Nach 4 Std bei 60° C.			
70	82	140	246	142	269	0,98	0,92
91	81	182	243	234	273	0,87	0,89
86	83	172	246	234	275	0,74	0,90
71	83	142	246	209	261	0,68	0,94
73	85	146	255	197	283	0,74	0,91
104	89	208	267	295	319	0,71	0,85
—	92	—	276	—	299	—	0,93
—	82	—	246	—	307	—	0,81
k_4 stdg. (im Mittel)				2‰ig = 0,77		3‰ig = 0,89	
				3. Nach 6 Std bei 60° C.			
73	95	146	285	221	352	0,66	0,81
70	96	140	288	207	338	0,67	0,85
75	71	150	213	213	286	0,70	0,74
76	63	152	189	225	232	0,67	0,82
77	82	154	246	251	303	0,61	0,82
78	82	156	246	247	307	0,63	0,80
87	60	174	180	262	256	0,66	0,72
88	74	176	222	279	320	0,63	0,65
82	—	146	—	245	—	0,62	—
k_6 stdg. (im Mittel)				2‰ig = 0,65		3‰ig = 0,77	

unsere Annahme, die von B. vorgelegte Menge Oxydationsmittel sei, abgesehen von dem Zeitfaktor, zur vollständigen Oxydation des Meth. nicht ausreichend, richtig war.

Errechnet man aus der Zusammenstellung der von O. an den Leichen seines Untersuchungsmaterials gewonnenen W.-Werten rückwärts den Verbrauch an Bichromat und setzt diesen in Beziehung zu den durch die quantitative Meth.-Best. nach Kolthoff-Deniges gefundenen Werten, so gelingt es auch hier, eine Konstante festzustellen, die —

Tabelle 3. *Zusammenstellung der Reduktionskonstanten für Methanol.*

1. Bei Verwendung von 0,1 g $K_2Cr_2O_7$ auf 100 cm³ H_2SO_4.

	2 ‰ig	3 ‰ig
Nach 2 Std . . .	1,46	1,78
„ 4 „ . . .	0,98	1,34
„ 6 „ . . .	0,94	1,28

2. Bei Verwendung von 0,25 g $K_2Cr_2O_7$ auf 100 cm³ H_2SO_4.

	2 ‰ig	3 ‰ig
Nach 2 Std . . .	1,08	1,10
„ 4 „ . . .	0,76	0,88
„ 6 „ . . .	0,64	0,76

3. Von Bildsten gefundene Konstante bei Verwendung von 0,05 g $K_2Cr_2O_7$ auf 100 cm³ H_2SO_4.

Nach 2 Std . . . 2,66

allerdings mit einer sehr viel größeren Schwankungsbreite — einen Mittelwert von 0,72 ergibt, wenn man eine Titration mit n/100 $Na_2S_2O_3$ annimmt. Daß dieser Wert fast ideal mit dem von uns gefundenen Faktor übereinstimmt, ist bei der Inhomogenität des zusammengestellten Untersuchungsmaterials, wobei die ausgefallensten Fälle nicht berücksichtigt wurden, sicherlich ein Zufall.

Die Zusammenstellung der Konstanten in Tab. 3 erlaubt somit die Schlußfolgerung, daß bei Benutzung einer Lösung von 0,05 Bichromat auf 100 cm³ und einer Erwärmungszeit von 2 Std die oxydative Umsetzung des Meth. nicht abgeschlossen ist und somit B. zu einem viel zu hohen Umrechnungsfaktor gelangen mußte, der aber weder mit der Tatsache, daß Meth. stärker reduzierend wirkt als Äth.-A. und seine Reduktion längere Zeit beansprucht, noch mit den Befunden von O. übereinstimmt. Wir gelangen somit zu der Feststellung, daß bei der Berechnung des Meth. im Blute ein Faktor von 0,64 für eine 2- und 0,76 für eine 3‰ige Meth.-Lösung im Mittel somit 0,70* zugrunde gelegt

* Es wäre wünschenswert, unsere Untersuchungen anderenorts überprüfen zu wollen.

werden muß, wenn man 1 cm³ einer $K_2Cr_2O_7$-Lösung von 0,25 g auf 100 H_2SO_4 vorlegt und die Oxydation bei 60° über 6 Std gehen läßt. Daraus ergibt sich eine $\frac{1{,}13}{0{,}70} = 1{,}63$*fach höhere Bichromat-reduzierende Kraft des Meth. gegenüber dem Äth.-A.*

Entgegen B. würde Meth. demnach einen 1,63fachen Betrag an Äth.-A. (bei 2stündiger Oxydation liegt der Wert etwas niedriger) vortäuschen, wenn ein nur Meth.-haltiges Getränk getrunken wird. Daß diese Tatsache unter Umständen von einer beträchtlichen Konsequenz für die forensische Beurteilung des Blutalkoholwertes sein kann, dürfte damit verständlich sein. Findet man z. B. einen Blutalkoholwert von $1{,}1^0/_{00}$ und steht fest, daß das genossene Getränk Meth. enthielt, so liegt der Wert, da ja der W.sche Faktor für Äth.-A. der Berechnung zugrunde gelegt wird, zu hoch. Der Untersuchte wird also zu Unrecht beschuldigt, unter einer höheren Alkoholwirkung gestanden zu haben. Im extremen Fall, d. h. unter der Annahme, das Getränk habe nur Meth. enthalten, würde sich aus der W.-Best. ein Meth.-Gehalt des Blutes von $\frac{1{,}1}{1{,}63} = 0{,}68^0/_{00}$ (bei 2stündiger Oxydation etwas höher) ergeben. Bei Meth.-Äth.-A.igen Getränken würden sich demnach die wirklichen Alkoholwerte zwischen diesen beiden Extremen ($1{,}1 : 0{,}68^0/_{00}$) bewegen, in jedem Falle jedoch unterhalb von $1{,}1^0/_{00}$.

In diesem Zusammenhang interessierte uns die Frage, von welcher Meth.-Konz. in einem genossenen Getränk an hat man im praktischen Falle eine Abweichung von der normalen Alkoholkurve zu erwarten, in welchem Verhältnis steht das Ausmaß dieser Abweichung vom Anteil des beigesetzten Meth. und welche Schlußfolgerungen sind daraus für die Praxis der Blutalkoholbeurteilung zu ziehen? Zur Klärung dieser Fragen wurden Versuche an Kaninchen durchgeführt. Es standen 2 Versuchstiere zur Verfügung, die beide etwa gleiches Gewicht hatten (A = 3,435 und B = 3,000 kg). Bei A handelt es sich um ein Weibchen mit reichlichem Fettansatz, während B ein kräftiger mehr muskulöser Bock war. Beiden Tieren wurden nun gleichermaßen Alkohollösungen mit abgestuften Meth.-Zusätzen intraperitoneal injiziert und zwar in jedem Falle 1,0 g pro Kilogramm Körpergewicht in einer 20%igen wäßrigen Lösung. Bei beiden Tieren wurde zunächst die normale Blut-(Äthyl-)Alkoholkurve bestimmt und danach die Kurven bei steigendem prozentualen Anteil Meth. — berechnet auf die stets konstant gehaltene Gesamtalkoholmenge — festgelegt. Dem Tier A wurden so Lösungen mit 20, 30 und 50% Meth., dem Tier B 20, 40 und reine Meth.-Lösungen zugeführt. Beide Tiere vertrugen diese Mengen gut. Es fiel nur auf, daß das Tier B, der Bock, im Beginn der Untersuchung für etwa 2 Std

eine ausgeprägte Hypotonie der Muskulatur und deutliche Ataxie der Bewegung aufwies, während das Weibchen A (reichlicher Fettansatz!) fast keinerlei Veränderungen erkennen ließ. Das Blut zur W.-Best. wurde in Zeitintervallen von 5, 10 und 15 min im Anfang und später alle 30 min über 5 Std mittels Capillaren den Ohrvenen entnommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Kurvenbildern I (Tier A) und II (Tier B) wiedergegeben. Die Errechnung der einzelnen Kurvenpunkte erfolgte — auch bei den reinen Meth.-Lösungen — mit dem W.schen Faktor für Äth.-A., was hier ja allein von Interesse war.

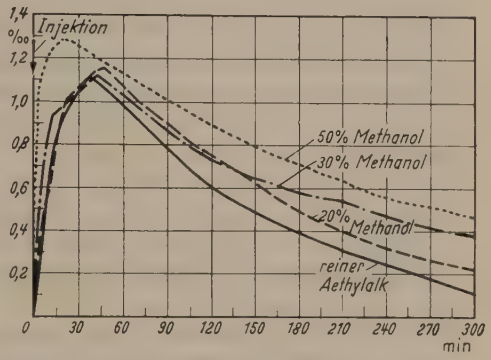


Abb. 1. Zusammenstellung I der Versuche 1, 3 und 5, 7 (Kaninchen A). ×———× WIDMARK-Kurve des Blutes nach reinem Äthyl-Alkohol (1 g/kg K.-Gew.). × --------× WIDMARK-Kurve des Blutes 80% Äthyl-Alkohol + 20% Methanol (insgesamt 1 g/kg K.-Gew.). ×-.-.-.-.-× WIDMARK-Kurve des Blutes 70% Äthyl-Alkohol + 30% Methanol (insgesamt 1 g/kg K.-Gew.). ×.....× WIDMARK-Kurve des Blutes 50% Äthyl-Alkohol + 50% Methanol (insgesamt 1 g/kg K.-Gew.).

Es fällt auf, daß die Kurven bei beiden Tieren von einem 20%igen Meth.-Anteil (4 g Meth. und 16 g Äth.-A. auf 100 cm³ des Getränkes) an von der reinen Äth.-A.-Kurve abweicht. Wenn auch dieser Effekt im wesentlichen erst wenig außerhalb der Fehlerbreite der W.-Methode gelegen ist, so wird doch die Tendenz einer langsameren Rückkehr zur Norm an den Enden der Kurven bei 300 min bereits offenbar. Bei 30% Meth.-Zusatz wird dieser Effekt in I deutlicher und liegt nach 1½ Std absolut außerhalb der Fehlerbreite. Von 40% Meth.-A. an verlaufen dann die Kurven weit oberhalb der reinen Äth.-A.-Kurve (II). Die an Tier B gewonnene reine Blut-Meth.-Kurve zeigt sehr eindrucksvoll die weit höhere Reduktionskraft des Meth. Im Anfangsteil ist

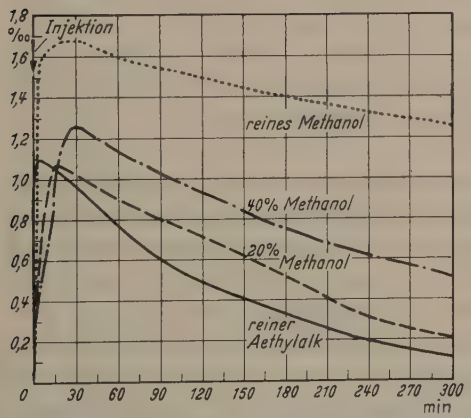


Abb. 2. Zusammenstellung II der Versuche 2, 4, 6, 8 (Kaninchen B). ×———× WIDMARK-Kurve des Blutes nach reinem Äthyl-Alkohol (1 g/kg K.-Gew.). ×--------× WIDMARK-Kurve des Blutes 80% Äthyl-Alkohol + 20% Methanol (insgesamt 1 g/kg K.-Gew.). ×-.-.-.-.-× WIDMARK-Kurve des Blutes 60% Äthyl-Alkohol + 40% Methanol (insgesamt 1 g/kg K.-Gew.). ×.....× WIDMARK-Kurve des Blutes nach reinem Methanol (1 g/kg K.-Gew.).

die gleiche Kurve somit eine schöne Bestätigung in vivo des von uns in vitro gefundenen um ein beträchtliches niedriger liegenden W.-Faktors des Meth. Mit steigendem Meth.-Zusatz werden außerdem die absteigenden Äste der Kurven immer flacher. Nach 4,5 Std ist bei Tier B der W.-Wert in der reinen Blut-Meth.-Kurve erst von 1,67 auf 1,25 abgesunken, während in der gleichen Zeit die Äth.-A.-Kurve von 1,1 auf 0,12 abgefallen ist. Das stimmt mit den Untersuchungsergebnissen von B., W. und B., die die Eliminationsgeschwindigkeit des Meth. untersucht haben, überein. Beim Kaninchen wäre demnach die Relation der Eliminationsfaktoren von Äth.-A. und Meth. 2,33 : 1, d. h. der *Äth.-A. wird 2,33mal so schnell eliminiert wie Meth.* Nach Rost wird Meth. im Stoffwechsel langsam zu Ameisensäure abgebaut. Dabei

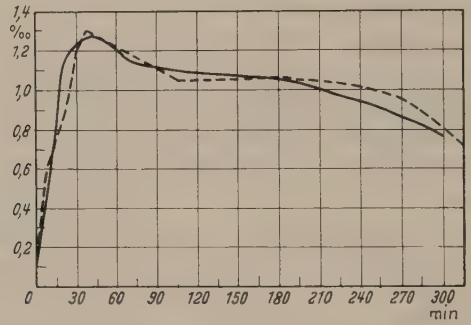


Abb. 3. Zusammenstellung III (Mensch). × ——— × Widmark-Kurve des Blutes nach reinem Äthyl-Alkohol (1 g/kg K.-Gew.). × -------- × Widmark-Kurve des Blutes. 98% Äthyl-Alkohol + 2% Methanol (1 g/kg K.-Gew).

ist zu bedenken, daß Ameisensäure selbst leicht flüchtig ist und Bichromat reduziert, womit die langdauernde Reduktionswirkung teilweise vielleicht erklärbar wäre. Auf Grund der Untersuchungenvon W. und B. und Olow ist bekannt, daß die Umsetzung des Äth.-A. sowie des Meth. beim Kaninchen wesentlich schneller vor sich geht als beim Menschen. Beim Menschen dürften demnach wahrscheinlich noch eindrucksvollere Kurven erwartet werden können. Daß jedoch die nicht zu beanstandenden Meth.-Beimengungen bis zu 2% (berechnet auf Gesamtalkoholmenge) in alkoholischen Getränken keine Veränderung der Blutalkoholkurve gegenüber einer reinen Äth.-A.-Kurve ergeben würde, war zu erwarten (Kurvenbild III).

Eine Gefahr der Fehlbeurteilung einer Alkoholintoxikation liegt somit in dem wesentlich niedrigeren Eliminationsfaktor für Meth. eher begründet als in dem stärkeren Reduktionsvermögen des Meth. allein. Ist es doch so, daß während der Äth.-A. innerhalb 24 Std praktisch vollkommen eliminiert ist, Meth. darüber hinaus noch einen W.-Wert

gibt, der bei der nunmehr erfolgenden Umrechnung mit dem W.schen Eliminationsfaktor (0,15‰/Std) — nach Jungmichel 0,12 — unmögliche Alkoholwerte zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Blutentnahme ergeben würde. Würde man so z. B. bei einem Manne 40 Std nach der Einverleibung eines Meth.-haltigen Getränkes einen W.-Wert von 0,5‰ finden, so würde unter der Annahme, der Mann habe nur Äth.-A. getrunken, sich eine Anfangskonzentration von 6,5‰ nach W. (5,3 nach Jungmichel) ergeben.

Zusammenfassung.

Angeregt durch die Untersuchungsergebnisse von Orthner wurde der von Bildsten 1924 mit der Widmark-Methode ermittelte Umrechnungsfaktor (Reduktionskonstante) für Methanol, der mit der verbrauchten Menge an Bichromat-Schwefelsäure multipliziert die in der Untersuchungsprobe vorliegende Meth.-Menge ergibt, einer Nachprüfung unterzogen. Diese Reduktionskonstante wurde zu 0,70 (auf n/100 Na-Thiosulfat) berechnet, ermittelt. Dieser steht eine solche von Bildsten von 2,66 gegenüber. Entgegen Bildsten, nach dem das Meth. demnach nur eine 0,425fache Reduktionskraft gegenüber dem Äth.-A. besitzt, errechnet sich aus unserem Faktor eine 1,63fach höhere Reduktionskraft des Meth. Durch unsere Untersuchungen konnte erbracht werden, daß Bildsten 1. eine zu schwach konzentrierte Bichromatlösung vorgelegt und 2. die Proben zu kurze Zeit bei 60° belassen hat. Wir fanden, daß eine Bichromatkonzentration von 0,25 g auf 100 H_2SO_4 und eine Belassung der Proben über 6 Std bei 60° erforderlich sind, um eine vollständige Umsetzung des zwar stärker aber träger als Äth.-A. reagierenden Meth. zu erreichen. Für die Praxis wird eine einfache Vorprobe darauf, ob nur Äth.-A. oder ins Gewicht fallende Meth.-Beimengungen im Blute vorliegen, durch Vergleich einer 6 Std-Probe mit den 2 Std-Werten vorgeschlagen.

Im Tierversuch an Kaninchen wurde die Frage untersucht, inwieweit durch die stärkere Reduktionskraft des Meth. die normale Blutalkoholkurve verändert werden und welche Konsequenzen eine solche Veränderung für die Beurteilung einer Alkoholintoxikation haben kann. Es wurde gefunden, daß beim Kaninchen ein sichtbarer Effekt auf die normale Blutalkoholkurve erst bei einem Meth.-Anteil ab 20% (berechnet auf die Gesamtalkoholmenge) auftritt und zwar im Sinne einer Überhöhung der Blutalkoholkurve einerseits und einer zunehmenden Abweichung mit Erreichen niedrigerer Werte, d. h. im absteigenden Schenkel der Kurve, andererseits. Der letztere Befund vor allem macht deutlich, daß bei Meth.-haltigen Getränken mit einem Meth.-Anteil von über 20% am Gesamtalkohol beim Kaninchen — beim

Menschen wird ein ähnlicher Effekt bereits von niedrigeren Meth.-Anteilen gemutmaßt — eine Zurückrechnung mit dem Eliminationsfaktor von Widmark (0,15) oder Jungmichel (0,12) die Fehlbeurteilung um so größer wird, je später nach der Einverleibung der Widmark-Wert bestimmt wird.

Literatur.

[1] Bildsten: Biochem. Z. **146**, 361 (1924). — [2] Nicloux u. Placet: J. Physiol. et Path. gen. **14**, (1912). — [3] Olow: Biochem. Z. **148**, 325 (1924). — [4] Orthner: Die Methyl-Alkohol-Vergiftung. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1950. — [5] Rost: Handb. d. Lebensm.Chem. Bd I, S. 993—1066 (1933). — [6] Widmark u. Bildsten: Biochem. Z. **148**, 325 (1924). — [7] Jungmichel: Alkohol-Best. im Blut. Berlin 1933.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 135—146 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Über die biologische Bedeutung des hohen Zink-Gehalts in Schlangengiften. Zink als Schlangengift-Inhibitor.

Von
A. Fleckenstein und H. Gerkhardt.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Juli 1951.)

Über den hohen Zink-Gehalt der Schlangengifte wurde 1919 zum erstenmal von C. Delezenne[6] auf Grund eingehender Untersuchungen an verschiedenen Giftschlangen-Arten berichtet: Mehr als 20% der Schlangengift-Asche kann Zinkoxyd sein, während K^+, Na^+, Ca^{++} und Mg^{++} mengenmäßig zurücktreten.

Im Trockengift der Kobra wurde 0,56% Zn gefunden, Toxin von Sepedon haemachates enthielt 0,33% Zn. Bei allen untersuchten Colubriden-Giften bewegte sich der Zink-Gehalt zwischen 0,56 und 0,31%; dagegen waren die Zink-Werte in den Viperiden-Giften regelmäßig etwas niedriger (0,23%—0,11%). Am wenigsten Zink enthielt das Giftsekret von Bitis arietans. In neueren Untersuchungen (1940) fand auch Ray[20] 0,46%—0,55% Zn im Gift von Naja naja bzw. Naja tripudians; für andere Colubriden-Gifte (z. B. Bungarus caeruleus, Bungarus fasciatus) wurden von Ray geringere Zink-Werte als von Delezenne angegeben. *Der Zinkgehalt des Kobragifts ist etwa 10—20mal höher als der normale Zink-Gehalt der Menschen- und Säugetier-Leber, wo gewöhnlich die höchsten Zink-Werte im Organismus gefunden werden* (vgl. E. Rost[21], Eichholtz[7], Eggleton[7]); der Zink-Gehalt des Kobragifts läßt sich nur vergleichen mit dem größenordnungsmäßig gleich hohen Zink-Gehalt von Insulin.

Weitere Untersuchungen von Delezenne[6] führten dann zu der Auffassung

a) daß der Zink-Gehalt der Schlangengifte in auffälliger Weise dem Schwefel-Gehalt parallel gehe (Kobragift 4,2% S, Sepedon haemachates-Toxin 3,3% S, Viperidengifte 2,5—1,7% S, Bitis arietans-Toxin 1,1% S,

b) daß der Zink-Gehalt auch einen Parallelismus zur Toxizität und besonders zu der fermentativen Wirkungsstärke der Schlangengifte erkennen lasse; denn die Intensität der Lysolezithin-Bildung und der Nukleinsäure-Spaltung war bei den zinkreichen Giften größer als bei den zinkarmen. Bitis arietans-Toxin mit dem geringsten Zink-Gehalt war z. B. auch in seiner Ferment-Aktivität am schwächsten. Die Aktivität zinkarmer Gifte konnte jedoch durch Zink-Zusatz nicht verstärkt werden. Delezenne zog 1919 aus seinen Befunden den Schluß: »*Le zinc est en effet l'élément mineral veritablement charactéristique des venins de serpents*« und »*l'activité est en relation quantitative avec l'abondance du zinc.*«

In den folgenden Untersuchungen ist die — seit Delezenne kaum mehr bearbeitete — Frage nach der biologischen Bedeutung des Zinks in den Schlangengiften mit neuer Methodik, d. h. unter Verwendung unserer beiden neuen Schlangengift-Teste *(Dehydrasen-Test* und *Dotterkoagulations-Test)* erneut aufgegriffen worden. Diese Prüfung erschien uns wichtig, a) weil nach Angaben von Ray[22] auch gereinigte, zinkarme Gifte noch voll aktiv sind, b) weil nach eigenen Beobachtungen auch die Eichholtzschen[8] Zinkkomplexbildner (Natriumferrocyanid, 6-8-Dioxychinolin) sowie Dithizon die Giftwirkung nicht abschwächen konnten.

Experimenteller Teil.

1. Wesen und Spezifität des Dotterkoagulations-Testes.

In Verfolgung einer Angabe von Boquet, Dworetzky und Essex[2] ist von uns (Fleckenstein und Fettig[10]) kürzlich gefunden worden, daß Bienengift und zahlreiche Schlangengifte die Fähigkeit des Eidotters zur

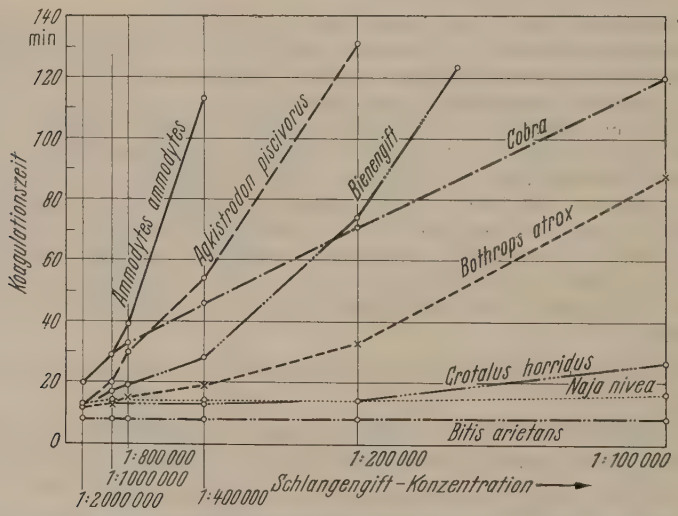


Abb. 1. *Verzögerung der Hitzekoagulation des Eidotters durch Schlangengifte in verschiedenen Konzentrationen.* Die Koagulationszeit bei Erhitzung des vergifteten Eidotters im Wasserbad von 93° C ist jeweils in Minuten angegeben. Die Inkubationsdauer der Gifte vor der Erhitzung betrug jeweils 2 Std bei 37° C.

Hitzekoagulation noch in millionenfacher Verdünnung herabsetzen können. Nach Einwirkung stärkerer Giftkonzentrationen (1 : 100000 bis 1 : 200000) ist unter Umständen selbst nach 3—4stündiger Erhitzung auf 93° C keine Koagulation mehr zu erzielen. Diese Koagulations-Verzögerung ist — bei gleichbleibender Inkubationszeit der Gifte — den angewandten Konzentrationen (vgl. Abb. 1) annähernd proportional,

doch muß dabei stets auch von der gleichen Dotteremulsion ausgegangen werden.

Die Wirkungsstärke der einzelnen Gifte auf den Eidotter geht den in unseren früheren Untersuchungen[9, 11, 12] *gefundenen dehydrasen-hemmenden Wirkungsstärken im Muskelbrei im großen und ganzen parallel*: Starke Dehydrasen-Gifte (Kobra, Ammodytes ammodytes, Sepedon haemachates, Agkistrodon contortrix, Agkistrodon piscivorus, Bienengift) sind auch im Dotter-Test hochaktiv. Schwache Dehydrasen-Gifte (Naja nivea, Crotalus horridus) wirken auch im Dotter-Test wenig. *Bitis arietans*-Toxin ist als schwächstes Dehydrasen-Gift im Eidotter (vgl. Abb. 1) praktisch ohne Effekt. Bei einzelnen Klapperschlangengiften bestehen jedoch zwischen der Dotter- und Dehydrasen-Wirkung gewisse Diskrepanzen.

Tabelle 1. *Beeinflussung der Bienengift- und Schlangengift-Effekte auf die Dotterkoagulation* durch antitoxische Sera.*

(Zeitdauer in Minuten bis zum Eintritt der Koagulation im Wasserbad von 93° C)
Normale Koagulationszeit ohne Gift = 7—10 min.

	Kobra-gift	Ammodytes-Gift	Bothrops-atrox-Gift	Crotalus-atricau-datus-Gift	Agkistrodon-contortrix-Gift	Bienengift
ohne Serum	93	> 120	28	62	> 120	> 180
mit Kobra-Serum** .	13	> 120	23	47	110	> 180
mit Ammodytes-Serum**	89	10	11	14	12	> 180
mit Serum ER** . .	93	40	17	43	102	> 180
mit Jararaca-Serum**	93	120	12	11	26	> 180

* Die Giftkonzentration im Eidotter (10 cm³ 40%ige Dotteremulsion in 0,9%iger NaCl-Lösung) war einheitlich 1 : 200000, die Inkubationszeit der Gifte vor der Erhitzung des Dotters auf 93° C betrug jeweils 2 Std im Wasserbad von 37° C.

** Auf 10 cm³ Dotteremulsion kam jeweils kurz vor dem Giftzusatz 1 cm³ Serum.

Das koagulations-hemmende Prinzip in Bienengift und Schlangengiften hat nach unseren Ergebnissen[10] offenbar Ferment-Natur: *Durch Phosphatase-Inhibitoren (Natriumfluorid, Natriumoxalat, Natriumzitrat, Natriumborat, Natriumtartrat, Phloridzin) lassen sich die Gifteffekte auf den Eidotter ganz oder teilweise verhindern.* Das koagulations-hemmende Prinzip ist demnach wahrscheinlich selbst eine Phosphatase oder entfaltet seine Wirkung in Zusammenarbeit mit Phosphatasen.

*Durch spezifisch antitoxische Sera*** läßt sich das koagulations-verzögernde Prinzip inaktivieren* (vgl. Tab. 1): Gegen Kobragift wirkt

*** Für die liebenswürdige Überlassung von Kobra-Serum C und von Serum ER sind wir Herrn Prof. Dr. P. Boquet vom Pasteur-Institut sehr zu Dank verpflichtet. Ammodytes-Serum und Jararaca-Serum wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Demnitz (Behring-Werke) zur Verfügung gestellt.

— ähnlich wie im Dehydrasen-Versuch — nur Kobra-Serum, dagegen sind Viperiden-Sera (Ammodytes-Serum, Jararaca-Serum, Serum ER) auch im Eidotter gegenüber Kobragift ohne jeden Effekt. Umgekehrt versagt Kobra-Serum gegenüber Ammodytes-Gift, während z. B. nach Zusatz des spezifischen Ammodytes-Serums die Koagulationszeit des Eidotters völlig normal bleibt. Gegen die Gifte von Bothrops atrox, Crotalus atricaudatus, Agkistrodon contortrix sind die geprüften Viperiden-Sera teilweise ebenfalls sehr aktiv; doch hat auch Kobra-Serum gewisse Schutzwirkungen. Die Dotter-Wirkung von Bienengift konnte dagegen durch keines der Schlangen-Sera gehemmt werden. *Es bestehen also weitgehende Übereinstimmungen zwischen den — im Dotter-Test, Dehydrasen-Test und auch an der weißen Maus ermittelten — Wirkungs-Spektren* der einzelnen Sera* (vgl. Fleckenstein und Schneiter[12]). Die Effekte von Bienengift und Schlangengiften sowie von geeigneten Inhibitoren bzw. antitoxischen Seren lassen sich also in einfachster Weise auch an Eidotter-Emulsionen quantitativ erfassen.

2. *Der Einfluß von Zinksalzen auf die Bienengift- und Schlangengift-Wirkungen im Dotterkoagulations-Test.*

Es wurde zunächst geprüft, ob Zusatz von Zinksalzen zum Eidotter den Ablauf der Vergiftung verändert.

Methode.

Jeweils 10 cm³ einer Eidotter-Emulsion (40% Eidotter in 0,9%iger NaCl-Lösung) wurden in breite Reagensgläschen (Länge 10 cm, innere Weite 2,1 cm) abgefüllt und dann die einzelnen Gifte in Konzentration 1 : 200000 (bezogen auf Trockengift) zugesetzt. In die Parallelansätze kamen vor Zugabe der Gifte wechselnde Mengen einer 1,0 molaren wäßrigen Zinkchlorid-Lösung (Endkonzentration im Eidotter 0,0025 bzw. 0,005 bzw. 0,01 bzw. 0,02 mol Zn^{++}/l). Nach einer Inkubationsperiode von 2 Std bei 37° C wurden dann die Koagulationszeiten im Wasserbad bei 93° C bestimmt. Der Dotter galt als koaguliert, wenn die gelbe Emulsion beim Umrühren nicht mehr an einem Glasstab haftete.

Bei Verwendung unserer breiten Reagenzgläschen und des relativ großen Quantums von 10 cm³ Dotteremulsion dauert es einige Minuten, bis nach dem Einbringen ins Wasserbad von 93° C die für die Koagulation erforderliche Temperatur erreicht wird; unter unseren Bedingungen tritt daher erst nach 7—10 min eine vollständige Koagulation der unvergifteten Dotteremulsion ein. Gibt man dagegen die Eidotteremulsion in enge Reagensgläschen mit dünner Wandung oder in Glaskapillaren, so erfolgt die Koagulation u. U. schon nach 1—2 min. Wir sind von der Verwendung der dickeren Röhrchen und des größeren Dotterquantums deshalb nicht abgegangen, weil die dadurch verursachte Verlängerung der Koagulationszeit des normalen Dotters angenehm ist; schon kleine Verzögerungen der Koagulationszeit, wie sie bei Anwendung von Schlangengiften in millionenfacher Verdünnung noch eintreten, sind dann bequem zu

* Auffällig ist, daß — anders als im Dehydrasen-Test — Serum ER gegen die Dotter-Wirkung der Viperiden-Gifte im allgemeinen schwächer zu schützen scheint als Ammodytes- und Jararaca-Serum.

erfassen. Wenn dagegen der normale Dotter schon nach 1—2 min koaguliert, wird auch die Bestimmung der gerade noch koagulationsverzögernden Giftkonzentrationen wegen der Kürze der zur Verfügung stehenden Beobachtungszeit schwieriger. Bei Anwendung stärkerer Bienengift- bezw. Schlangengift-Konzentrationen ist der Einfluß der Gläschenweite und des Dotter-Quantums gering, weil dann die Zeit des anfänglichen Aufwärmens der Dotteremulsion auf 93° C — im Verhältnis zu der starken Verlängerung der Koagulationszeit — nicht mehr stärker ins Gewicht fällt.

Das Ergebnis der Prüfung (vgl. Tab. 2) war überraschend: *Während $ZnCl_2$ in der zugegebenen Menge die normale Koagulationszeit des unvergifteten Eidotters (etwa 7—10 min) von sich aus etwas verlängert, werden die Bienengift- und Schlangengift-Effekte auf den Eidotter weitgehend unter-*

Tabelle 2. *Hemmung der Bienengift- und Schlangengift-Wirkungen auf den Eidotter durch Zinkchlorid in verschiedenen Konzentrationen.*

(Zeitdauer in Minuten bis zum Eintritt der Koagulation im Wasserbad von 93° C.)

Gifte (In der Dotter-Emulsion jeweils Konz. 1 : 200000)	Vergiftet ohne Zn^{++}	Vergiftet bei 0,02 mol Zn^{++}-Konz.	Vergiftet bei 0,01 mol Zn^{++}-Konz.	Vergiftet bei 0,005 mol Zn^{++}-Konz.	Vergiftet bei 0,0025 mol Zn^{++}-Konz.
Kobragift	> 180	12*	14*	22*	37*
Sepedon haemachates. .	> 240	23	56	111	240
Bienengift.	110	17	26	40	110
Ammodytes ammodytes .	> 240	22	23	34	65
Agkistrodon piscivorus .	230	14	19	87	147
Agkistrodon contortrix .	162	20	24	35	40
Crotalus adamanteus . .	79	18	19	30	40
Crotalus viridis.	100	18	21	32	53
Bothrops atrox.	38	18	24	—	—
Giftfreie Kontrollen ohne bzw. mit $ZnCl_2$. . . .	7—10	12—14	10—11	10—11	9—10

* Bei Kobragift wurde Zinkazetat verwendet.

drückt. Bei einer Zink-Konzentration von 0,02 mol/l ist z. B. nur noch ein kleiner Bruchteil der normalen Giftaktivität vorhanden; auch 0,01 mol Zink hemmt die Gifte noch sehr stark, 0,005 und 0,0025 mol Zink ist meist ebenfalls noch deutlich wirksam. Dieser Effekt ist für Zink spezifisch; denn auch andere Zinksalze (Zinksulfat, Zink-valerianat, Zinklaktat, Zink-azetat, Zink-salizylat) besitzen in gleicher Mol-Konzentration dieselbe — unter Umständen auch noch stärkere — Wirkung wie $ZnCl_2$.

Besonders geeignet ist Zinkazetat, da es in den angewandten Konzentrationen die Dotterkoagulation von sich aus nicht beeinträchtigt. Durch 0,02 mol Zinkazetat ließ sich die Kobragift-Konzentration 1 : 10000 noch vollständig und Konzentration 1 : 1000 noch weitgehend neutralisieren. Selbst die Kobragift-Konzentration 1 : 100 war bei Anwesenheit von 0,06 mol Zinkazetat/l Dotteremulsion praktisch wirkungslos; bei 0,04 mol erfolgte die Koagulation nach 30 min, bei 0,03 mol nach 79 min.

Dagegen wirken äquimolare Konzentrationen von $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$ und $CaCl_2$ im Eidotter auf die geprüften Gifte weder deutlich fördernd noch hemmend; das gleiche gilt für Ferrosulfat und Nickelsulfat.

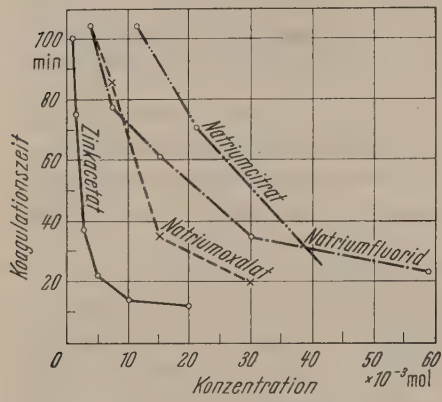


Abb. 2. *Unterdrückung des dotterkoagulations-verzögernden Effektes von Kobragift (Konz. 1 : 200000) durch verschiedene Konzentrationen von Zinkazetat, Natriumoxalat, Natriumfluorid, Natriumcitrat.* Zinkazetat wirkt erheblich stärker als die anderen Inhibitoren.

Werden die Zinksalze erst nachträglich nach Ablauf der Giftinkubation dem Eidotter zugesetzt, so können dadurch die verlängerten Koagulationszeiten nicht mehr reduziert werden; Zink ist dann wirkungslos.

Um bessere Vergleiche zu ermöglichen, wurden auch die anderen von uns[10] gefundenen Schlangengift-Inhibitoren (Natriumfluorid, Natriumoxalat, Natriumzitrat) jeweils in abgestuften Konzentrationen im Dotter-Test geprüft. In Abb. 2 sind als Beispiel die Koagulationszeiten bei Einwirkung von Kobragift (Konz. 1 : 200000) in Abhängigkeit von der Mol-Konzentration der verschiedenen Inhibitoren dargestellt. Die Abbildung läßt erkennen, daß Kobragift durch Zinkazetat stärker als durch Oxalat, Fluorid und Zitrat gehemmt wird (Phloridzin wirkt ebenfalls schwächer). Auch die Gifte von Sepedon haemachates, Ammodytes ammodytes, Agkistrodon piscivorus, Agkistrodon contortrix, Crotalus adamanteus und Crotalus viridis (jeweils Konz. 1 : 200000) werden in der Reihenfolge Zn^{++} > Oxalat > Fluorid > Zitrat abgeschwächt. Lediglich Bienengift ist in charakteristischer Weise gegen Fluorid stärker empfindlich als gegen Oxalat (vgl. Abb. 3), so daß sich hier mit abnehmender Wirkungsstärke die Reihe Zn^{++} > Fluorid > Oxalat > Zitrat ergibt; der Wirkungsunterschied zwischen Zn^{++} und Fluorid ist aber bei Bienengift meist nicht groß.

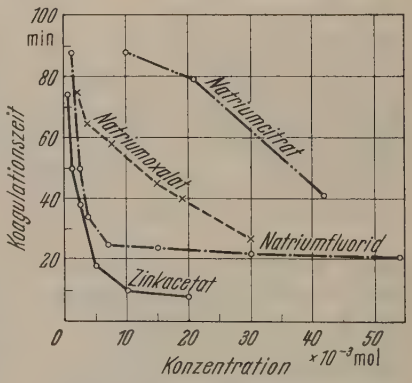


Abb. 3. *Unterdrückung des dotterkoagulations-verzögernden Effektes von Bienengift (Konz. 1 : 200000) durch verschiedene Konzentrationen von Zinkazetat, Natriumfluorid, Natriumoxalat, Natriumcitrat.* Zinkazetat wirkt auch gegenüber Bienengift am stärksten; durch Fluorid wird Bienengift mehr gehemmt als durch Oxalat.

Sehr wesentlich ist, daß die Gifte durch Zink weder zerstört noch irgendwie bleibend abgeschwächt werden: Kobragift, Bienengift und Crotalus-viridis-Gift, die von uns in dieser Hinsicht genauer untersucht wurden, bewahren z. B. auch in einer 0,3 mol Zinkchlorid-Lösung ihre volle Wirksamkeit. *Für die Aktivität der Gifte im Eidotter ist immer nur entscheidend, welche Zn^{++}-Konzentration im Eidotter selbst vorliegt; dagegen ist es bedeutungslos, ob die Gifte schon vor der Zugabe in den Eidotter mit Zinksalzen inkubiert worden sind oder nicht.* Zink blockiert also vermutlich nicht irgendwelche — für die toxische Wirkung — entscheidenden Komponenten der Gifte selbst, sondern macht nur die Reaktionsorte für das Gift unangreifbar.

Der Gedanke lag nahe, daß Zn^{++} seinen hemmenden Einfluß auf Bienengift und Schlangengifte durch Verdrängung eines eventuellen Aktivators (Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++} oder Ca^{++}) ausüben könne; es wäre dann unter Umständen zu erwarten gewesen, daß der Zinkeffekt durch gleichzeitige Zugabe eines dieser Salze in den Eidotter wieder abzuschwächen wäre. Es zeigte sich jedoch bei keinem der geprüften Salze (jeweils 0,02 mol Konzentration/l) und bei keinem der in Tab. 2 aufgeführten Gifte eine nennenswerte, dem Zink entgegengerichtete Wirkung.

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen ist also eindeutig: Zink ist im Dotter-Test der stärkste Bienengift- und Schlangengift-Inhibitor.

3. Der Einfluß von Zinksalzen auf die Bienengift- und Schlangengift-Wirkungen im Dehydrasen-Test.

In den folgenden Untersuchungen wurde geprüft, ob auch das dehydrasenhemmende Prinzip in Bienengift und Schlangengiften durch Zinksalze gehemmt wird.

Methode.

Sämtliche Ergebnisse wurden wieder mit unserer — früher schon genau beschriebenen[9] — Methode an Muskelpräparaten von Fröschen gewonnen. Die vergifteten Ansätze enthielten

a) 1 g Muskelpräparat (mit Phosphatpuffer in der üblichen Weise 5mal gewaschen),

b) Giftstammlösung in 0,6%iger NaCl-Lösung,

c) 0,6%ige NaCl-Lösung ad 2,5 cm^3.

Nach 3 Std dauernder Inkubation der Gifte bei 30° C wurde

d) 1 cm^3 0,2 mol Natriumzitrat-Lösung in Phosphatpuffer als Substrat,

e) 1 cm^3 Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (Konzentration 1 : 200 in Phosphatpuffer) als Wasserstoff-Akzeptor nach Kuhn u. Mitarb.[16, 19],

f) 0,6%ige NaCl-Lösung ad 5,0 cm^3 in die Röhrchen gegeben.

Sämtliche Konzentrationsangaben der Gifte (jeweils ausgehend vom Trockengift) sind auf diese 5 cm^3 Flüssigkeitsinhalt der Ansätze bezogen. Nach Absättigung mit Leuchtgas wurden die Röhrchen für 1—3 Std in ein Wasserbad von 30° C gebracht. Anschließend wurde das durch Hydrierung von Triphenyltetrazoliumchlorid gebildete rote Triphenylformazan in Methylalkohol ausgeschüttelt und photometrisch bestimmt. Giftfreie Kontrollen mit und ohne Substrat wurden jeweils in der gleichen Weise behandelt.

Zur Prüfung des Einflusses von Zn^{++} wurde in die Röhrchen zuerst die berechnete Menge Giftstammlösung (b) + die berechnete Menge 0,6%ige NaCl-Lösung (c) + 0,1 bzw. 0,2 cm³ einer 0,4 mol $ZnSO_4$-Lösung in Aqua dest. gegeben. Nach 10 min Stehen dieser Mischung bei Zimmertemperatur kam dann in jedes Röhrchen 1 g Muskelpräparat (a). Gleichzeitig wurden unvergiftete Kontrollen mit $ZnSO_4$ bereitet. Bei Zusatz der Lösungen (d) und (e) nach Ablauf der Inkubationszeit fällt Zinkphosphat aus. Für den weiteren Verlauf der Versuche ist Zn^{++} auch unnötig, da in Anwesenheit von Zitrat (Lösung (d)) die Vergiftung praktisch nicht mehr fortschreiten kann.

Tatsächlich wird auch das dehydrasenhemmende Prinzip in den Schlangengiften durch Zink blockiert (vgl. Tab. 3). Obwohl $ZnSO_4$ in einer Konzentration von 0,008—0,016 mol/Liter die normalen De-

Tabelle 3. *Hemmung der Bienengift- und Schlangengift-Wirkungen auf die Zitronensäure-Dehydrase durch Zinksulfat.*

(Bildung von Triphenylformazan in γ/1 g Muskelpräparat mit und ohne $ZnSO_4$-Zusatz.) Jeweils Mittelwerte aus 2 Parallelversuchen.

Gifte	Gift-Konzentrationen	Unvergiftete Kontrollen			Vergiftete Ansätze		
		ohne Zn^{++}	bei 0,008 mol Zn^{++}-Konz.	bei 0,016 mol Zn^{++}-Konz.	Zn^{++} ohne	bei 0,008 mol Zn^{++}-Konz.	bei 0,016 mol Zn^{++}-Konz.
Bienengift	1 : 800000	470	560	400	0	180	235
Sepedon haemachates	1 : 200000	860	780	353	0	170	180
Kobra	1 : 100000	1165	1000	653	0	311	123
Agkistrodon piscivorus	1 : 400000	890	—	405	75	—	345
		783	755	—	113	414	—
Agkistrodon contortrix	1 : 400000	860	780	352	0	245	240
Ammodytes ammodytes	1 : 400000	920	895	350	0	185	298
Crotalus viridis . . .	1 : 20000	783	755	—	0	113	—
Crotalus adamanteus.	1 : 5000	785	754	403	0	196	293
Crotalus atrox . . .	1 : 10000	568	493	278	40	213	175
Bothrops atrox . . .	1 : 50000	920	895	350	0	210	210

hydrierungsprozesse von sich aus schon etwas schädigt, ist die Menge des gebildeten Triphenylformazans in den vergifteten Ansätzen mit Zink weit größer als in den vergifteten Ansätzen ohne Zink. Die geprüften Gifte der Colubriden (Naja naja, Sepedon haemachates) weisen dabei die gleiche Hemmbarkeit durch Zink auf wie die Gifte der Vipern (Ammodytes ammodytes) und Crotaliden (Agkistrodon piscivorus, Agkistrodon contortrix, Crotalus adamanteus, Crotalus atrox, Crotalus viridis, Bothrops atrox). Auch die dehydrasenhemmende Wirkung von Bienengift wird durch Zink abgeschwächt. Dagegen konnten wir bei der uns vorliegenden Giftcharge von Crotalus atricaudatus praktisch keine Beeinflußbarkeit durch Zink feststellen.

Mit gleicher Versuchsanordnung wurde auch geprüft, ob Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++} bzw. Ca^{++} irgendwelche Einflüsse auf das dehydrasen-hemmende Prinzip ausüben; die Konzentrationen dieser Salze waren auf Grund eingehender Vorversuche jeweils gerade so gewählt, daß höchstens eine mäßige Beeinträchtigung der normalen Dehydrasen-Aktivität durch den Salz-Zusatz eintreten konnte. Es ergab sich nun, daß $MnCl_2$ (Konzentration 0,004 mol/l) und $CaCl_2$ (Konzentration 0,0005 bis 0,00025 mol/l) keine abschwächende Wirkung auf die Effekte von Bienengift und Schlangengiften in den Ansätzen ausüben. $CaCl_2$ scheint sogar in manchen Fällen — bei Kobragift recht deutlich — den dehydrasen-hemmenden Einfluß der Schlangengifte zu verstärken. (Bei der Prüfung der Lysolezithin-Bildung und des weiteren Lysolezithin-Abbaus durch Kobragift ist auch von Kudicke und Sachs[18] eine aktivierende Wirkung von Ca^{++} beschrieben worden.) Dagegen schwächen sowohl $CoCl_2$ (Konzentration 0,004 mol/l) als auch $MgCl_2$ (Konzentration 0,016 mol/l)

Tabelle 4. *Beeinflussung der Bienengift- und Schlangengift-Wirkungen auf die Zitronensäure-Dehydrase durch $CoCl_2$ und $MgCl_2$.*
(Bildung von Triphenylformazan in γ/1 g Muskelpräparat mit und ohne Zusatz von $CoCl_2$ bzw. $MgCl_2$.)

Gifte	Gift-Konzentrationen	Unvergiftete Kontrollen		Vergiftete Ansätze		Unvergiftete Kontrollen		Vergiftete Ansätze	
		ohne Co^{++}	bei 0,004 mol Co^{++}-Konz.	ohne Co^{++}	bei 0,004 mol Co^{++}-Konz.	ohne Mg^{++}	bei 0,016 mol Mg^{++}-Konz.	ohne Mg^{++}	bei 0,016 mol Mg^{++}-Konz.
Bienengift	1 : 800000	266	233	0	145	255*	240*	0*	0*
Sepedon haemachates	1 : 200000	540	480	0	330	228*	218*	0*	0*
Kobra	1 : 400000	425	318	80	195	268	248	10	203
Agkistrodon piscivorus	1 : 400000	266	223	0	120	265	248	40	150
Agkistrodon contortrix	1 : 400000	266	223	10	160	265	248	0	98
Ammodytes ammodytes	1 : 400000	266	223	20	215	228*	214*	0*	60*
Crotalus viridis . . .	1 : 40000	—	—	—	—	245	235	40	198
Crotalus adamanteus	1 : 5000	266	223	25	203	—	—	—	—
Crotalus atrox . . .	1 : 10000	266	223	110	215	245	235	0	60
Bothrops atrox . . .	1 : 50000	266	223	0	88	245	235	0	45

* Mittelwerte aus 3 Versuchen.

die Giftwirkung auf die Dehydrierungsprozesse in den meisten Fällen ab (vgl. Tab. 4). Die mit Kobalt erzielten Effekte entsprechen annähernd den Effekten von Zink; Magnesium ist weniger wirksam. Im Dotter-Test waren, wie oben bereits mitgeteilt, Kobalt und Magnesium wirkungslos.

Besprechung.

Die vorliegenden Untersuchungen an Eidotter und Muskelbrei zeigen, daß Bienengift und Schlangengifte durch Zinksalze gehemmt werden. Dieser Zink-Effekt ist im Dotter-Test spezifisch und erheblich stärker als die Wirkung der anderen Schlangengift-Inhibitoren. Dabei verursacht Zink keine Zerstörung oder bleibende Abschwächung der Gifte, sondern schützt offenbar nur die Reaktionsorte — in Abhängigkeit von der jeweiligen Zink-Konzentration — vor dem Giftangriff.

Der hohe Zinkgehalt in den Schlangengiften scheint also auf Grund der vorliegenden Untersuchungen eine ganz andere physiologische Bedeutung zu haben, als Delezenne[6] annahm: *Zink ist ein natürlicher Hemmstoff, durch den sich wahrscheinlich die Drüse gegen die schädigende Wirkung des eigenen Giftsekrets schützt.*

Die im flüssigen, frischen Gift der Kobra vorkommende Zink-Konzentration wäre — aus dem Zink-Gehalt des Trockengiftes berechnet — mit etwa 0,02—0,03mol/Liter anzusetzen. Im Eidotter genügt diese Zink-Konzentration, um selbst eine Kobragift-Konzentration 1 : 1000 weitgehend zu blockieren. Man müßte also vermuten, daß das frische Giftsekret der Kobra durch den Zink-Gehalt gebremst ist und erst bei Verdünnung voll aktiviert wird. Auch der Zink-Gehalt der Viperiden-Gifte scheint meist noch im Bereich der im Eidotter wirksamen Zink-Konzentrationen zu liegen. Da die Schlangen bekanntlich gegen das eigene Gift (auch bei Injektion) außerordentlich resistent* sind, ist anzunehmen, daß unter Umständen schon eine begrenzte Abschwächung der Giftaktivität durch Zink für die Schlange voll ausreichend ist. Der von Delezenne vertretene Parallelismus zwischen dem Zink-Gehalt und der Ferment-Aktivität (Lysolezithin-Bildung, Nukleinsäure-Spaltung) müßte also wohl so gedeutet werden, daß gegenüber hochaktiven Schlangengiften mehr Zink zur Neutralisation in der Drüse benötigt wird, als gegenüber schwachen Giften. Dieser ganze Fragenkomplex bedarf aber noch einer genaueren experimentellen Bearbeitung. Von besonderer Wichtigkeit werden hier weitere Versuche am ganzen Tier über die Möglichkeit der Giftinaktivierung durch Zink sein. Nach unseren bisherigen Ergebnissen am Kaninchenauge mit Bienengift und Kobragift (Konzentration 1 : 200 in Ringer-Lösung, Einträufelung von 0,3 cm^3 Lösung in den Konjunktivalsack) läßt sich sowohl die Entzündung als auch die Schmerzreaktion durch einen 1%igen Zinkazetat-Zusatz in die Giftlösung unterdrücken. Diese Wirkung scheint keine unspezifisch adstringierende zu sein; denn in Vergleichsversuchen mit Allylsenföl (Konzentration 1 : 1000) ist Zink ohne Effekt.

Die Hemmung der Dotter-Wirkung von Bienengift und Schlangengiften durch typische Phosphatase-Inhibitoren[10] scheint — wie bereits erwähnt — sehr dafür zu sprechen.

---

* Die tödliche Dosis (subkutan) des Giftes der australischen Tigerschlange (Notechis scutatus) ist für 1 kg dieser Schlange 180000mal größer als für 1 kg Meerschweinchen (Kellaway[17]). Bei der Aspis-Viper wurde als Dosis let. minima etwa 1100 mg/kg festgestellt; die Dosis für Ratten und Meerschweinchen betrug dagegen nur 1,8 mg/kg (Phisalix[22]). Diese Immunität ist zum Teil durch Antitoxine des Blutes bedingt; Serum der Aspis-Viper kann z. B. Aspis-Toxin ähnlich wie ein — durch Immunisierung von Pferden gewonnenes — antitoxisches Serum neutralisieren (Boquet[1]).

a) daß das koagulationsverzögernde Prinzip seiner Natur nach irgendeine Phosphatase ist, bzw. mit Phosphatasen zusammenwirkt,

b) daß vermutlich auch Zink diese — bisher noch nicht näher zu definierende — phosphat-abspaltende Reaktion blockiert.

Fermentwirkungen dieser Art sind bei Schlangengiften sowie bei den Hummel- und Wespengiften[4, 5] nicht unbekannt; so sind z. B. Phosphomonoesterasen und Phosphodiesterasen in zahlreichen Schlangengiften anzutreffen (Uzawa[24], Takahashi[23], Gulland und Jackson[14]). Ebenso ist die Existenz einer durch Kobalt aktivierbaren (Zeller[26]) 5-Nukleotidase (Gulland und Jackson[14]), sowie einer durch Magnesium aktivierbaren Adenosintriphosphatase (Zeller[25]) gesichert. Die schon von Delezenne beschriebene Aufspaltung von Hefe-Nukleinsäure wurde auch neuerdings wieder bestätigt. Nach Chain[3] kann das Gift der australischen Tigerschlange auch die Cozymase unter Abspaltung von Phosphat inaktivieren. Falls dieser Befund auch für weitere Schlangengifte zutreffend wäre, könnte sich hieraus wenigstens zum Teil eine Erklärung für die dehydrasenhemmende Wirksamkeit der Schlangengifte ergeben. Nach eigenen Untersuchungen[9, 10] kann auch die Wirkung von Bienengift und Schlangengiften auf die Zitronensäure-Dehydrase des Muskels durch Phosphatase-Inhibitoren wie Fluorid und Zitrat erheblich gehemmt werden.

Neuere Untersuchungen mit radioaktivem Zn^{65} weisen darauf hin, daß Zink besondere Affinitäten zu Desoxyribonucleo-proteiden besitzt (Heath und Liquier-Milward[15]); andererseits wurde von Greenstein und Hoyer[13] über eine Aufhebung der Hitze-Koagulation von Eieralbumin und anderen Proteinen durch Desoxyribonucleinsäure sowie weniger hochpolymere Spaltprodukte der Desoxyribonucleinsäure berichtet. Man wird wohl bei der weiteren Bearbeitung dieser Probleme vor allem den Wirkungen der Schlangengifte auf Nucleoproteide eine besondere Beachtung schenken müssen.

Zusammenfassung.

Unter Verwendung unserer neuen Schlangengift-Teste (Dehydrasen-Test und Dotterkoagulations-Test) ergab sich:

1. Bienengift und zahlreiche Schlangengifte können die Hitze-Koagulation des Eidotters noch in hunderttausendfacher Verdünnung aufheben. Die Intensität dieses Effektes geht den dehydrasen-hemmenden Wirkungsstärken der Gifte, abgesehen von einigen Ausnahmen, parallel. Das koagulations-hemmende Prinzip hat höchstwahrscheinlich Fermentnatur und wird — ebenso wie das dehydrasenhemmende Prinzip — in vitro durch antitoxische Sera inaktiviert.

2. Durch Zinksalze ($ZnCl_2$, $ZnSO_4$, Zinkvalerianat, Zinklaktat, Zinkazetat, Zinksalizylat) werden die Bienengift- und Schlangengiftwirkungen auf den Eidotter spezifisch gehemmt. Zinksalze sind bei weitem stärker als die anderen von uns gefundenen Schlangengift-Inhibitoren (Natriumfluorid, Natriumoxalat, Natriumzitrat, Phloridzin). Auch das dehydrasenhemmende Prinzip in Bienengift und Schlangengiften wird durch Zink blockiert.

3. Zink verursacht keine Zerstörung oder bleibende Abschwächung der Gifte, sondern schützt anscheinend in Abhängigkeit von der jeweiligen Zink-Konzentration die Reaktionsorte vor dem Giftangriff. Der hohe Zinkgehalt in den Schlangengiften schirmt die Drüse gegen die schädigende Wirkung des eigenen Giftsekrets ab.

4. Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++}, Fe^{++}, Ni^{++} und Ca^{++} verursachen — im Gegensatz zu Zn^{++} — im Eidotter keine Giftabschwächung. Im Dehydrasen-Versuch wirkt Co^{++} und Mg^{++} meist ähnlich wie Zn^{++}; Mn^{++} ist ohne Einfluß, Ca^{++} scheint unter Umständen die dehydrasen-hemmende Wirkung zu verstärken. Die Untersuchungen erstreckten sich — abgesehen von Bienengift — auf Gifte der Colubriden (Kobra, Sepedon haemachates) und Viperiden (Sandviper, Bitis arietans, Agkistrodon piscivorus, Agkistrodon contortrix, Crotalus viridis, Crotalus adamanteus, Crotalus atrox, Crotalus atricaudatus, Bothrops atrox).

Literatur.

[1] Boquet, P.: Ann. Inst. Pasteur **71**, 340 (1945). — [2] Boquet, P., M. Dworetzky u. H. E. Essex: Amer. J. Physiol. **161**, 561 (1950). — [3] Chain, E.: Biochemic. J. **33**, 407 (1939). — [4] Contardi, A., u. A. Ercoli: Biochem. Z. **261**, 275 (1933). — Erg. Enzym. Forsch. **5**, 213 (1936). — [5] Contardi, A., u. P. Latzer: Biochem. Z. **197**, 222 (1928). — [6] Delezenne, C.: Ann. Inst. Pasteur **33**, 68 (1919). — [7] Eggleton, W. G. E.: Biochemic. J. **34**, 991 (1940). — [8] Eichholtz, F.: Zink, Handb. exper. Pharmakol. III, 3, S. 1909 (1934). — Eichholtz, F., u. A. Birch-Hirschfeld: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **170**, 271 (1933). — [9] Fleckenstein, A., G. Berg, J. Gayer u. S. Schönig: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 265 (1951). — Fleckenstein, A., u. J. Gayer: Klin. Wschr. **28**, 789 (1950). — [10] Fleckenstein, A., u. B. Fettig: Z. Naturforschung **6b**, 213 (1951). — [11] Fleckenstein, A., H. Tippelt u. H. Kroner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 380 (1950). — [12] Fleckenstein, A., u. W. Schneiter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 537 (1951). — [13] Greenstein, J. P., and M. L. Hoyer: J. of biol. Chem. **182**, 457 (1950). — [14] Gulland, J. M., u. E. M. Jackson: Biochemic. J. **32**, 590, 597 (1938). — [15] Heath, J. C., u. J. Liquier-Milward: Biochim. et Biophys. Acta **5**, 404 (1950). — [16] Jerchel, D., u. W. Möhle: Ber. dtsch. chem. Ges. **77**, 591 (1944). — [17] Kellaway, C. H.: zit. nach O. Gessner, Tierische Gifte, Heffters Handbuch der exper. Pharmakologie, Erg.-Werk Bd. 6, S. 1. — [18] Kudicke, R., u. H. Sachs: Biochem. Z. **76**, 359 (1916). — [19] Kuhn, R., u. D. Jerchel: Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 941, 949 (1941). — [20] Ray, P.: J. Indian Chem. Soc. **17**, 681 (1940). — [21] Rost, E.: Arb. Reichsgesdh.amt **52**, 1 (1920). — Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **29**, 549 (1919). — Rost, E., u. A. Weitzel: Arb. Reichsgesdh.amt **51**, 476, 494 (1919). — [22] Phisalix, M.: Animaux vénimeux 1. u. 2. Paris 1922. — [23] Takahashi, H.: J. Biochem. (Jap.). **16**, 447, 463 (1932). — [24] Uzawa, S.: J. Biochem. (Jap). **15**, 19 (1932). — [25] Zeller, E. A.: Experientia **4**, 194 (1948). — Helvet. Chim. Acta **33**, 821 (1950). — [26] Zeller, E. A.: Arch. Biochem. **28**, 138 (1950).

Dozent Dr. A. Fleckenstein, z. Zeit Oxford (England), Dept. of Pharmacology.

Arch. exper. Path. und Pharmakol., Bd. 214, S. 147—151 (1952).

Aus der Universitäts-Frauenklinik Münster/Westf.
(Direktor: Prof. Dr. W. Bickenbach).

Über die Verwendung von Mäusen zur Prüfung pyretischer und antipyretischer Substanzen.

Von
O. Nacke.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. August 1951.)

Die Ergebnisse der Prüfung pyretischer und antipyretischer Substanzen weichen infolge der unterschiedlichen Reaktion der einzelnen Tiere auf das zu prüfende Pharmakon erheblich voneinander ab. Genauere Bestimmungen sind daher nur aus Mittelwerten größerer Versuchsreihen zu erhalten. Von mir wurde ein Verfahren für große Testserien mit Mäusen ausgearbeitet*.

Die Methode stellt eine Weiterentwicklung der Versuchsanordnung von Heubner[1] dar. Dieser hielt Mäuse im „Wärmekasten" und maß nach einer Gewöhnungszeit von 6 Tagen die Temperatur der Tiere mit Quecksilberthermometern. Buschke und Ollendorf[2] stellten weitere Versuche mit Mäusen an. Sie benutzten ebenfalls Quecksilberthermometer, hielten die Tiere aber nicht bei konstanter Außentemperatur.

Bei der Anwendung jener Methoden ergaben sich mir Schwierigkeiten. Ich verfuhr daher folgendermaßen: Die Mäuse wurden in einem Thermostaten gehalten, da nach den Feststellungen von Heubner[1] die Mäuse in bezug auf die Höhe und Konstanz ihrer Körpertemperatur sehr stark von der Außentemperatur abhängig sind. Die höchste Konstanz der Körpertemperatur erhielt ich bei einer Außentemperatur von 22° C. Der Thermostat war 90 cm breit, 70 cm hoch und 50 cm tief. Er hatte an seiner Vorderwand ein Einblickfenster und zwei Handeingriffe mit Manschetten, so daß alle Arbeiten, wie Spritzen und Messen im Kasten selbst durchgeführt werden konnten. Die Frischluft wurde von einem Gebläse über Heizwiderstände, die am Boden angebracht waren, in den Kasten befördert. Durch die hierdurch erzielte starke Luftbewegung ließ sich im Thermostaten eine Temperaturkonstanz von — 0,1° C erzielen. Die Heizwiderstände wurden mit einem Kontaktthermometer über ein Relais geregelt.

Quecksilber- und elektrische Widerstandsthermometer** sind wegen der langen Einstellzeit ungeeignet, da die Rektaltemperatur der Mäuse nach eigenen Beobachtungen durch die heftigen Abwehrbewegungen während der Messungen in 1 min bis zu 1,5° C ansteigt, wie es auch von Bierens de Haan[3] angegeben worden ist.

* Aus äußeren Gründen konnte dieser methodische Teil einer Arbeitsreihe, deren Ergebnisse schon im Band 207 (1949) dieses Archives veröffentlicht wurden, erst jetzt fertiggestellt werden.

** Herrn Prof. Hase von der Technischen Hochschule Hannover sei hier nochmals für die Anfertigung von Widerstandsthermometern für Mäuse und für die Unterstützung meiner Arbeit besonders gedankt.

Ich verwendete Kupfer-Konstantan-Thermoelemente. Die Meßlötstelle wurde aus 0,05 mm dünnen Drähten hergestellt, um eine Schnelleinstellung zu erreichen. Diese dünnen Drähte lötete ich in einer Länge von 20 mm an solche von 0,5 mm Durchmesser. um nicht durch den großen Widerstand der dünnen Drähte eine zu geringe Spannung am Meßinstrument zu erhalten. Die Meßlötstelle wurde in eine 15 mm lange und 1,3 mm im Querschnitt messende Kanüle weich eingelötet. Diese Kanüle wurde mit Bleiglätte und Glyzerin in ein Glasrohr, das als Griff diente, eingekittet. Die Füllung des Glasrohres erfolgte mit Picein (siehe Abb. 1). Als Meßinstrument verwendete ich ein Spiegelgalvanometer mit einem inneren Widerstand von 17 Ohm.

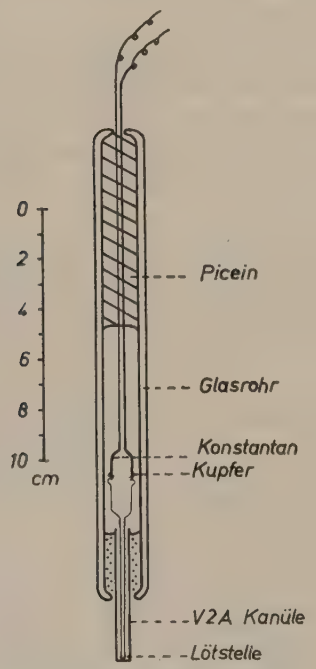


Abb. 1. Temperaturfühler mit Thermoelement zur rektalen Temperaturmessung bei Mäusen.

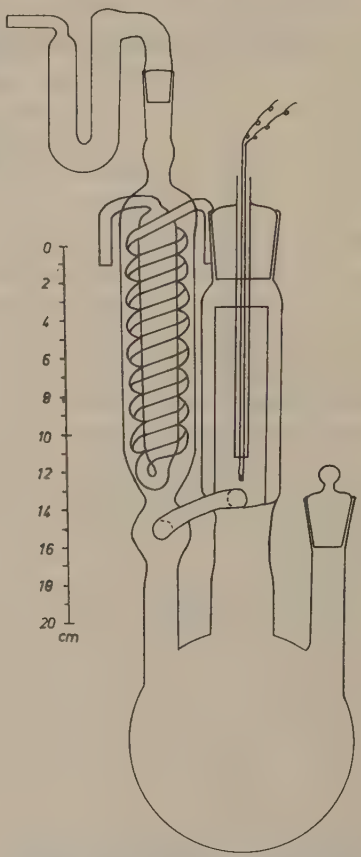


Abb. 2. Äthersiedegerät zur Erzeugung einer konstanten Bezugstemperatur für die „kalte Lötstelle" des Thermoelementes.

Da der Widerstand des Thermoelementes 7 Ohm betrug und die Thermospannung des Kupfer-Konstantan-Elementes $4{,}1 + 10^{-6}$ Volt/0,1° C beträgt, floß bei einer Temperaturdifferenz von 0,1° C gegenüber der sogenannten „kalten Lötstelle" ein Strom von $1{,}7 \times 10^{-7}$. Dies ergibt bei einer Empfindlichkeit des Instrumentes von 4×10^{-8} A/mm/m bei einer Lichtzeigerlänge von 1,7 m einen Ausschlag von 7,2 mm/0,1° C. Die Einstellzeit der Meßanordnung betrug etwa 0,7 sec, da der äußere Widerstand mit 7 Ohm gut an den aperiodischen Grenzwiderstand von 9 Ohm angepaßt werden konnte. Der gesamte Meßvorgang einer Maus nahm so nicht mehr als 10 sec in Anspruch.

Als Bezugstemperatur für die sogenannte „kalte Lötstelle" diente die Siedetemperatur des Methyläthers von 34,79° C bei 67 mm Hg. Das Äthersiedegefäß befand sich in einem Wasserbade, das durch Kontaktthermometer und Relais auf 50° C gehalten wurde. Der Ätherdampf kondensierte in einem Rückflußkühler und lief von dort wieder in das Gefäß zurück (siehe Abb. 2).

Am geeignetsten für Temperaturuntersuchungen erwiesen sich männliche weiße Mäuse mit einem Mindestgewicht von 20 g. Nach einer Akklimatisation von etwa 3 Tagen wurde die Normaltemperatur der Tiere 3 Tage lang gemessen, und nur Mäuse mit guter Temperaturkonstanz in den Versuch genommen.

Aus den Einzelversuchen wurden die Mittelwerte errechnet und in Kurven dargestellt. Die Breite des dreifachen mittleren Fehlers* markierte ich durch Schraffierung des Streuungsbereiches.

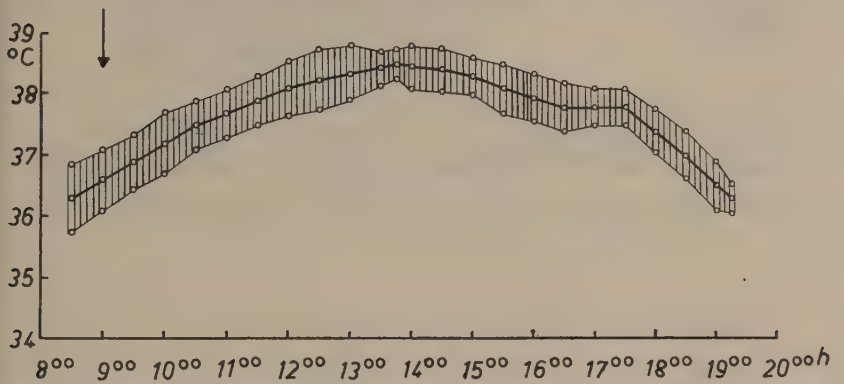


Abb. 3. Fieberstich: Bei ↓ Fieberstich in Äthernarkose mit Injektion von 0,01 cm³ Tetrahydroanaphhylamin. Mittelwert von 13 Mäusen, Schraffierung gleich dreifachem mittleren Fehler.

Als typische Temperaturreaktionen der Maus seien hier die Ergebnisse von 3 Versuchsreihen angeführt.

1. Temperaturanstieg nach Fieberstich (siehe Abb. 3). Den Fieberstich führte ich mit einer Kanüle aus, die ich 3 mm kaudal von der Verbindungslinie zwischen beiden Ohren bis auf die Schädelbasis einbohrte. Intrazerebrale Injektion von Tetrahydrobetanaphthylamin ist dann angebracht, wenn ein besonders lang dauerndes Fieber gewünscht wird.

---

* Standardabweichung $= \sigma \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{r} y_i (x_i - m)^2}$

σ = Standardabweichung, n = Umfang, y_i = Häufigkeit, x_i = Variante, m = arithmetischer Mittelwert.

Dreifacher mittlerer Fehler: $3\,fm = \pm \frac{\sigma}{3\sqrt{n}}$

Nach Ringleb, F., Math. Methoden d. Biol. — Teubner-Verlag, Berlin-Leipzig 1937.

2. Temperaturanstieg nach Pyrifer (siehe Abb. 4 und 5). Nach 100 Einheiten Pyrifer pro 20 g Maus betrug die Dauer des Temperaturanstieges vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Abfall zur Normal-

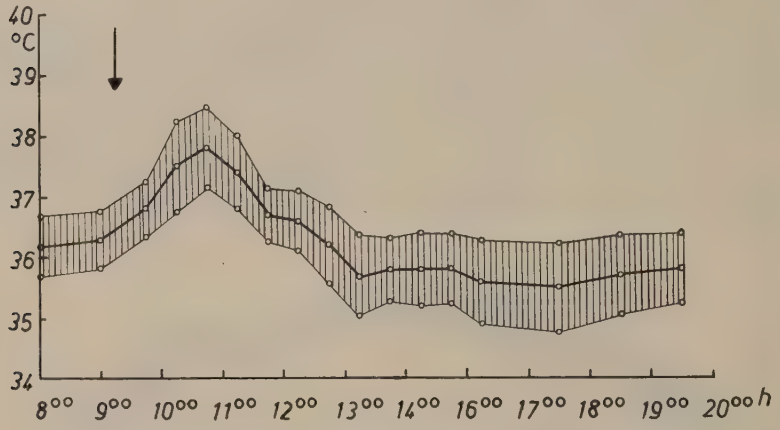


Abb. 4. Mittelwert des Temperaturverlaufes von 26 Mäusen. Bei ↓ Injektion von 100 E Pyrifer/20 g Maus intraperitoneal. Schraffierung gleich dreifachem mittleren Fehler.

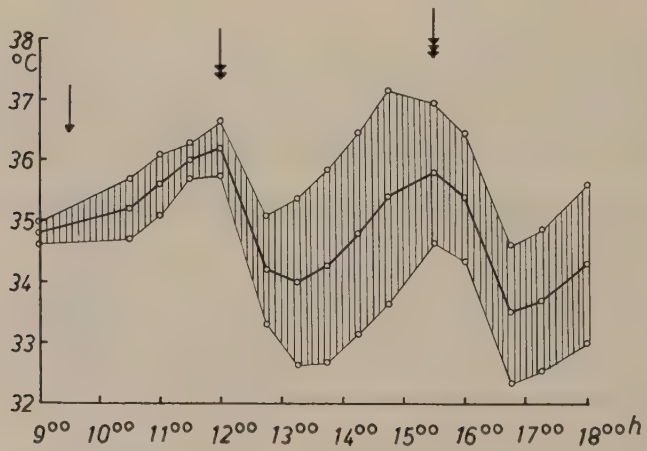


Abb. 5. Temperatursenkung nach intraperitonealer Injektion von Anoixol und Badional. Bei ↓ Fieberstich mit intrezerebraler Injektion von Tetrahydrobetanaphthylamin, bei ↓ 0,6 mg Anoxiol intraperitoneal, bei ↓ 0,025 g Badional intraperitoneal. Mittelwert von 6 Mäusen. Schraffierung gleich dreifachem mittleren Fehler.

temperatur in 3 Versuchsgruppen von je 6, 8 und 9 Mäusen 210, 207 und 195 min. Die höchste erreichte Temperatur lag in den 3 Gruppen 1,6° C, 1,4° C und 1,6° C über dem Ausgangswert.

Dieses Ergebnis zeigt die erhebliche Sicherheit des Temperaturanstieges nach 100 Einheiten Pyrifer bei Mäusen. Die Ansicht von Hundshagen[4], der den

Temperaturanstieg nach „hohen Dosen“ von Pyrifer bei Mäusen für ein sehr unzuverlässiges Zeichen hält, konnte ich also nicht bestätigen. Interessieren dürfte in diesem Zusammenhang, daß Buschke und Ollendorf[2] Mäuse mit Spirochäta recurrens infizierten und anschließend mit 100 Einheiten Pyrifer behandelten. Sie konnten bei den so vorbehandelten Tieren kein Pyriferfieber erzeugen.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode geschildert, die die Verwendung von Mäusen zur Untersuchung pyretischer und antipyretischer Substanzen erlaubt. Die hierdurch möglichen großen Versuchsserien sichern eine erhebliche Genauigkeit des Ergebnisses. Die erforderliche Apparatur wird beschrieben und typische Reaktionen der Mäuse auf pyretische und antipyretische Substanzen aufgezeigt.

Literatur.

[1] Heubner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 530 (1933). — [2] Buschke u. Ollendorf: Klin. Wschr. **10** II, 2087 (1931). — [3] Bierens de Haan: Arch. Entw. mechan. **50**, 1 (1922). — [4] Hundshagen: Z. Immunforschg **90**, 295 (1937).

Dr. Otto Nacke, (21a) Ehrsen, Post Schötmar/Lippe.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 152—157 (1952).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Schoen).

Über die lipotrope Wirkung von Vitamin E und Cystin, Methionin, Inosit und Invertzucker an der tetrachlorkohlenstoffvergifteten Ratte*.

Von
F. Hartmann, R. Hertel, G. Schulze und H. Wellmer.

(Eingegangen am 6. August 1951.)

Die Gruppe der lipotropen Substanzen wurde zunächst durch das Cholin und seine Vorläufer mit einer labilen CH_3-Gruppe, Methionin und Betain repräsentiert. Den Wirkungsmechanismus dieser Stoffe stellte man sich so vor, daß die in die Leber von den Fettdepots abgegebenen Neutralfette diese nur als Phosphatide, von denen 95% cholinhaltig sind, wieder verlassen könnten. Geschieht das aus Mangel an Cholin oder seinem Vorläufer nicht, so bleibt das Neutralfett in der Leber liegen. Experimentell wurde diese Theorie dadurch gestützt, daß sich bei Cholin- und Methioninmangel in der Tat Neutralfette in der Leber ablagern, die cholinhaltigen Blutphosphatide und die Leberphosphatide aber absinken. Die mit CCl_4 verfettete Leber des Hundes gibt unter Methionin- und Cholineinwirkung das eingelagerte Fett schneller ab als bei unbehandelten Tieren. Die cholinhaltigen Blutphosphatide steigen dabei offenbar unter dem Einfluß dieser Substanzen schneller an[1].

Außer den genannten Substanzen wird nach neueren Untersuchungen auch dem Invertzucker und dem Inosit eine lipotrope Wirkung zugeschrieben.

Remy[2] fand an der Ratte unter Invertzuckergaben bei Vergiftung mit CCl_4 einen geringeren Gesamtlipoidgehalt der Leber als bei unbehandelten Tieren. Best u. Mitarb.[3] sahen bei Versuchen mit Kostformen, die zu einer Leberverfettung führten, eine lipotrope Wirkung des Inosits. Der Wirkungsmechanismus des Invertzuckers und Inosits im Fettstoffwechsel der Leber ist bisher unklar. Auf Grund der gegenwärtigen Vorstellungen darf aber vermutet werden, daß die lipotrope Wirkung dieser Substanzen mit der von Cholin und seinen Vorläufern nicht identisch sein kann.

Hinsichtlich ihrer Wirkung im Leberstoffwechsel stehen den lipotropen Substanzen das Vitamin E und das Cystin nahe.

Himsworth hat mit Vitamin E-Mangel bzw. einer cystinarmen Kost an der Ratte Lebernekrosen erzeugen können. Channon[4] fand eine Leberverfettung durch Cystin. Hohe Dosen von Cystin führen ebenfalls zur Lebernekrose. Himsworth[5] stellt sich auf Grund der Untersuchungen von Hickman und Harris[6] den Wirkungsmechanismus so vor, daß das Tocopherol für das Gleichgewicht zwischen den reduzierten SH und den oxydierten SS-Gruppen der Redoxsysteme verantwortlich

* Herrn Professor Dr. Rudolf Schoen zum 60. Geburtstag.

ist. Tocopherol- oder Cystinmangel soll zu einer Verarmung an Sulfhydrilgruppen und zur Lebernekrose führen. Die Zwischenstufe vom SH-Gruppenmangel zur Nekrose sind unbekannt. Jedoch wissen wir aus früheren Untersuchungen, daß die Nekrose einer Verfettung nachfolgen kann.

Den folgenden Untersuchungen lagen zwei Fragestellungen zugrunde. Einmal fehlt bisher der Beweis dafür, daß die Neutralfettablagerung in der Leber tatsächlich Folge einer mangelnden Phosphatidsynthese ist. Ebensogut können die niedrigen Blutphosphatidwerte durch eine Ausschwemmungshemmung in der Leber zustande kommen. Ferner sollte versucht werden, über eine genaue Analyse der Leberfette in den unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der drei genannten Substanzgruppen Einblick zu gewinnen. Für die Versuche wurde die tetrachlorkohlenstoffvergiftete Ratte gewählt. Bei ihr kann man eine gut reproduzierbare Leberverfettung erzeugen. Außerdem hat Binet[7] gezeigt, daß die Leber unter CCl_4 einen starken Glutathionsverlust erleidet, eine gute Voraussetzung für die Versuche mit Vitamin E und Cystin.

Versuchsanordnung.

Zum Versuch wurden 139 Ratten aus 2 Zuchten im Gewicht von 100—150 g genommen. Die Tiere wurden 1 Woche vor und während der Versuchszeit mit Weißbrot ernährt. Die Vergiftung erfolgte mit 0,5 cm^3 Tetrachlorkohlenstoff pro 100 g Rattengewicht täglich subkutan. Zur Kontrolle wurden zunächst 41 Tiere genommen, von denen 8 gleich getötet und einer Leberfettanalyse unterzogen wurden. Die zweite Gruppe von 9 Tieren wurde 5 Tage mit Tetrachlorkohlenstoff vergiftet und dann getötet. Die dritte Gruppe von 10 Tieren wurde 9 Tage mit Tetrachlorkohlenstoff vergiftet. 14 Tiere wurden erst nach einer 5tägigen Erholung im Anschluß an die Vergiftung getötet. In der Erholungsphase läßt sich der Abtransport des eingelagerten Fettes am besten verfolgen.

Die Prüfung der lipotropen Substanzen erfolgte in zwei Gruppen. 1. Verabreichung der Substanzen während der Vergiftung und Tötung der Tiere am Ende der Vergiftungsperiode. 2. Vergiftung, 5 Tage Erholung und während der Erholung Verabreichung lipotroper Substanzen.

Die Lebern wurden histologisch mit der Sudanfärbung auf Fett untersucht. Die chemische Analyse der Leberfette erfolgte nach folgender von Schulze entwickelten Methode: Die Tiere wurden durch Scherenschlag dekapitiert, und die Leber sofort entnommen. Ein von ihr abgetrenntes Stück wurde zur histologischen Untersuchung in 30% Formalin gebracht. Der Rest des Lebergewebes (etwa 3 g) wurde schnellstens in flüssige Luft verbracht und ständig von flüssiger Luft bedeckt im Mörser zerkleinert. Das so gewonnene Gewebepulver wurde in vorgewogene und mit 96% Alkohol (10 cm^3) beschickte Porzellanschälchen verbracht und bei 105° im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Abkühlen wurden die Ansätze dann zurückgewogen und so die Trockensubstanzmenge bestimmt. Sie wurde dann in Anlehnung an die von Millner angegebene Methode zunächst mit 95% Methanol und dann mit Methanol und Petroläther im Wechsel extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, im Vakuum eingedampft und einmal über Petroläther gereinigt. Die so gewonnene Lipoidmenge — im folgenden als „Gesamt-Lipoide" bezeichnet — wurden dann mit Hilfe chromatographischer Adsorptionsmethoden[8,9,10] an Zucker und Aluminiumoxyd getrennt und quantitativ bestimmt. Die

Bestimmung des freien Cholesterins wurde entweder als Cholesterin-Digitonid oder mit der Methode nach Schmidt-Thome[5] durchgeführt.

Die Ergebnisse aus 3 Versuchsreihen (II—IV) sind in Tab. 1 den an 8 Normaltieren bestimmten physiologischen Leberlipoidwerten (I) gegenübergestellt. Bei den Zahlen handelt es sich um Mittelwerte. Sie sind nur soweit ausgewertet, als die Unterschiede statistisch gesichert sind.

In Gruppe II wurden die Ratten vergiftet und während der Vergiftung mit lipotropen Substanzen behandelt. Die Trockensubstanz der Leber bleibt in allen Fällen etwa gleich. Die Gesamtlipoide steigen unter der Vergiftung jedoch auf das 3fache an, ebenso die Phosphatide. Die Verfettung beruht aber vorwiegend auf einer Neutralfetteinlagerung. Sie ist deutlich abhängig von der Dauer der Vergiftung. Eine lipotrope Wirkung während der Vergiftung mit CCl_4 ist nur für die Kombination Vitamin E + Cystin nachweisbar. Sie macht sich lediglich in einer geringeren Einlagerung des Neutralfettes bemerkbar.

In Gruppe III wurde bei der gleichen Rattenzucht die Wirkung der lipotropen Substanzen auf den Rückgang der Verfettung nach Absetzen der Vergiftung bestimmt. Schon durch die Erholung kommt es zu einem Abtransport des Neutralfettes. Dieser wird stark beschleunigt durch Inosit und Vitamin E. Die Neutralfetteinlagerung wird intensiver unter der Wirkung von Cystin.

Die Tiere der Gruppe IV wurden in gleicher Weise wie die Tiere der Gruppe III behandelt. Es handelt sich hier nur um Tiere einer anderen Zucht, die auf die gleiche Tetrachlorkohlenstoffgabe mit einer stärkeren Verfettung reagierte. Eine lipotrope Wirkung ließ sich für Invertzucker, Methionin und Vitamin E nachweisen. Bei der Kombination von Methionin und Invertzucker kommt es offenbar zu einer Summierung der Effekte beider Substanzen. In der Kombination von Vitamin E und Cystin wird die Vitamin E-Wirkung durch das Cystin abgeschwächt.

Bei den Leberphosphatiden beobachtet man in allen Versuchsreihen einen Anstieg unter der Vergiftung. Die erhöhten Phosphatide werden unter der Wirkung der lipotropen Substanzen in der in diesen Versuchen gewählten Versuchsdauer nicht gesenkt. Über die anderen Fettfraktionen läßt sich nichts Einheitliches aussagen.

Durch die histologische Untersuchung werden die chemischen Befunde weitgehend bestätigt. Jedoch besteht keine eindeutige Beziehung zwischen dem Grad der histologisch nachweisbaren Leberverfettung und den Leberfettwerten. Offenbar hängt die färberische Darstellbarkeit der Leberfette von dem Verhältnis der Phosphatide zu den Neutralfetten ab. Art und Anordnung der Leberverfettung entspricht den bereits früher von uns am Hund beschriebenen Verhältnissen.

Tabelle 1.

Zahl der Tiere	Dauer der CCl_4-Vergiftung in Tagen	Erholungsdauer	Behandlungsdauer	Behandlungsart	Zahl der Versuchstiere	Trockensubstanz in % der Frischsubstanz	in % Trockensubstanz							
							Gesamtlipoide	Phosphatide	Neutralfette	Kohlenwasserstoffe und Wachse	Sterinester	Freie Sterine	Freie Fettsäuren	Unbekannte Substanz
8	—	—	—	—	8	30,9	15,6	4,0	3,7	0,6	1,1	0,6	1,0	4,4
9	5	—	—	—	9	30,5	36,5	6,3	13,2	2,1	1,3	0,3	1,3	9,5
10	9	—	—	—	10	29,5	44,3	10,3	23,0	1,2	0,9	1,8	4,7	2,6
8	9	—	—	Inosit	8	32,4	42,8	10,3	23,0	1,9	1,4	2,4	2,5	2,5
6	9	—	—	Invertzucker	6	32,4	40,6	11,4	26,0	1,0	1,6	0,5	2,5	0,0
7	9	—	—	Vitamin E	7	28,0	40,5	13,1	19,2	1,39	1,62	1,2	2,3	2,4
6	9	—	—	Vitamin E + Cystin	6	30,6	30,1	11,2	15,6	0,8	0,9	1,16	0,8	2,6
8	9	5	—	—	8	31,8	31,7	11,2	16,6	0,82	0,9	0,7	0,6	1,6
8	9	5	5	Inosit	8	29,5	29,0	12,3	13,0	0,8	1,0	1,1	0,3	1,4
5	9	5	5	Vitamin E	5	32,7	23,4	8,8	10,4	1,01	0,72	0,6	0,96	0,73
6	9	5	5	Cystin	6	32,6	35,1	11,1	20,0	1,0	1,0	0,8	0,1	1,4
6	9	5	—	—	6	36,6	49,3	7,9	32,7	1,2	1,09	1,5	1,0	3,9
15	9	5	5	Invertzucker	15	31,5	29,08	11,7	13,9	0,8	0,9	1,0	0,3	2,1
9	9	5	5	Methionin	9	31,9	34,4	10,8	19,5	1,06	1,3	0,6	0,78	1,6
8	9	5	5	Methionin + Invertz.	8	26,6	24,9	12,1	8,1	0,45	0,56	0,7	1,6	1,3
8	9	5	5	Vitamin E + Cystin	8	33,25	37,5	10,44	21,66	1,1	1,0	0,86	2,1	1,72
12	9	5	5	VitamiCE	12	30,75	34,1	10,5	17,4	0,6	1,1	1,1	2,08	1,58

Gruppe I = Normaltiere.

Gruppe II = Behandlung mit lipotropen Substanzen während CCl_4-Vergiftung (Zucht 1).

Gruppe III = Behandlung mit lipotropen Substanzen nach CCl_4-Vergiftung (Zucht 1).

Gruppe IV = Behandlung mit lipotropen Substanzen nach CCl_4-Vergiftung (Zucht 2).

Dosierung der lipotropen Substanzen (g/Tag/100 g Ratte): Inosit 0,1; Invertzucker 0,4; Vitamin E 0,01; Cystin 0,1; Methionin 0,04.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Veränderungen der Leberlipoide bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung entsprechen nicht den Vorstellungen, die man sich bisher über die Leberverfettung gemacht hat. Die Einlagerung von Neutralfett

geschieht offenbar nicht, weil die Neutralfette nicht mehr in Phosphatide umgebaut werden können, sie geht also nicht mit einer Abnahme der Phosphatide einher. Sie kann also nicht auf einer Unfähigkeit der Leber, Phosphatide zu synthetisieren, beruhen. Diese steigen im Gegenteil unter der Verfettung ebenfalls an, allerdings später und im Verhältnis zu den Neutralfetten weniger stark als diese. Da im Blut bei Hunden unter Tetrachlorkohlenstoffvergiftung aber niedrige Phosphatid- und relativ hohe Neutralfettwerte gefunden wurden, kann man annehmen, daß die Verfettung der Leber zunächst einmal durch eine vermehrte Einschwemmung von Neutralfett aus der Peripherie verursacht ist. Die Leber versucht, des erhöhten Angebots Herr zu werden und steigert die Phosphatidsynthese. Diese ist aber nicht ausreichend, sämtliche Neutralfette umzubauen. Außerdem scheint eine Hemmung der Phosphatidabgabe aus der Leber zu bestehen, die die niedrigen Blutphosphatidwerte erklären könnte. Für diese Auffassung spricht, daß unter der Erholung nach Absetzen des Giftes auch nach Zusatz lipotroper Substanzen zunächst die Neutralfette geringer werden, während die Leberphosphatide unverändert hoch bleiben. Andererseits steigen die erniedrigten Blutphosphatidwerte gleich nach Absetzen des CCl_4 an. Auch dieser Befund fügt sich in den Zusammenhang ein, daß der Abtransport der Neutralfette über die Phosphatidsynthese geht. Diese bleibt offenbar solange gesteigert, bis der physiologische Neutralfettgehalt der Leber annähernd erreicht ist.

Auch die Vorgänge unter der Einwirkung der lipotropen Faktoren fügen sich in diese Vorstellung ein. Inosit und Invertogen erwiesen sich während der Vergiftung als unwirksam. Das Vitamin E aber und vor allem die Kombination von Vitamin E und Cystin hatten eine deutliche lipotrope Wirkung, die dadurch belegt wird, daß die Neutralfettwerte in der Leber der so behandelten Tiere signifikant niedriger liegen als bei den Kontrolltieren. Gleichzeitig liegen die Phosphatidwerte aber höher, vor allem unter Einwirkung des Vitamin E. Offenbar kann die Leber unter Vitamin E-Schutz das Neutralfett über eine gesteigerte Phosphatidsynthese besser abbauen. Noch deutlicher kommt dieser Mechanismus bei der Prüfung der lipotropen Wirkung im Stadium des Abtransportes des während der Vergiftung eingelagerten Fettes zum Ausdruck. Je wirksamer sich hier die Substanzen in der Erniedrigung des Neutralfettes erweisen, um so höher sind die Phosphatidwerte.

In der Erholungsphase zeigen sowohl Inosit wie Invertzucker und Methionin eine gute lipotrope Wirkung. Am besten ist sie in der Kombination von Invertzucker und Methionin, wobei sich die Wirkungen der beiden Substanzen summieren. Ein quantitativer Vergleich zum Inosit läßt sich der Dosierungsunterschiede wegen nicht ziehen. Das Vitamin E ist auch in der Erholungsphase lipotrop wirksam. Jedoch besteht ein

wesentlicher Unterschied in der Wirkung der Kombination von Vitamin E und Cystin. Während im Verlauf der Vergiftung der Vitamin E-Effekt durch Cystin verstärkt wird, wird er in der Erholungszeit abgeschwächt. Das paßt zu der Beobachtung, daß Cystin allein eine Leberverfettung hervorruft, wie aus Tab. 1 zu ersehen ist.

Über einen grundsätzlichen Unterschied im Wirkungsmechanismus der geprüften Faktoren vermögen die vorliegenden Untersuchungen nur wenig auszusagen. Methionin, Inosit und Invertzucker verhalten sich, soweit man das auf Grund der fraktionierten Untersuchung der Leberlipoide beurteilen kann, ähnlich. Die Kombination Vitamin E und Cystin hat anscheinend eine breitere Wirksamkeit. Jedoch vermag die Leberfettanalyse ihren speziellen Angriffsort im Fettstoffwechsel bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung auch nicht aufzuklären.

Zusammenfassung.

1. An tetrachlorkohlenstoffvergifteten Ratten wird die lipotrope Wirkung von Methionin, Invertzucker, Inosit, Vitamin E und Cystin geprüft. Während der Vergiftung vermag nur Vitamin E bzw. Vitamin E + Cystin die Neutralfettablagerung herabzusetzen.

2. Beim Abtransport des in die Leber eingelagerten Neutralfettes erweisen sich alle geprüften Substanzen außer dem Cystin als lipotrop wirksam.

3. Ein unterschiedlicher Wirkungsmechanismus der verschiedenen Substanzen ließ sich nicht aufklären.

Literatur.

[1] Hartmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 107 (1951). — [2] Remy: Z. ges. inn. Med. **5**, 607 (1950). — [3] Best, Lucas, Patterson u. Rideout: Science **103**, 12 (1946). — [4] Channon: Biochemic. J. **34**, 866 (1940). — [5] Himsworth: Proc. roy. Soc. Med. XVII, **4**, 201 (1949). — [6] Hickman u. Harris: Advances in Enzymol. **6**, 469 (1946). — [7] Binet, Weller, Gondond: C. r. Soc. biol. Paris **124**, 1141 (1937). — [8] Trappe: Biochem. Z. **305**, 150 (1940); **306**, 316 (1940); **307**, 97 (1940). — [9] Kathen: Arch. f. Mikrobiol. **14**, 4, 602 (1949). — [10] Schulze u. Südhof: Pflügers Arch. (im Druck).

Dr. F. Hartmann, Göttingen, Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 158—164 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
(Direktor: Professor Dr. A. W. Forst).

Einfluß der Methylsubstitution auf die Hämiglobin- (Methämoglobin-) Bildung und die Allgemeintoxizität des Anilins.

Von
Melchior Reiter und Karl Leusser*.

(Eingegangen am 9. August 1951.)

Anilin und Nitrobenzol bilden bekanntlich nicht direkt Hämiglobin (Methämoglobin = Hb(3)), sondern erst nach Umwandlung in Phenylhydroxylamin[1]. Die Hb(3)-Bildung durch beide Substanzen wird deshalb von der Geschwindigkeit abhängen, mit der im Organismus ihre Amino- bzw. Nitrogruppe durch Oxydation oder Reduktion in die Hydroxylamingruppe überführt werden.

Methylierung des Nitrobenzols am Benzolring hemmt die Umbildung der Nitrogruppe in die reaktionsfähige Form, denn die Hb(3)-Bildung durch die Nitrotoluole beträgt höchstens ein zwanzigstel der Hb(3)-Bildung durch Nitrobenzol (von Bredow und Jung[2]), während die Wirksamkeit der entsprechenden Methylderivate des Phenylhydroxylamins etwa 70% der des Phenylhydroxylamins beträgt (Schlimme[3]).

Wir untersuchten den Einfluß der Methylsubstitution auf die Hb(3)-bildende Wirksamkeit des Anilins. Anlaß dazu gab die Beobachtung, daß die Wirkungsstärke des m-Nitroanilins im Gegensatz zu der des Nitrobenzols durch Methylierung (1-Methyl-2-amino-4-nitrobenzol) nicht vermindert wird[4].

Die von uns untersuchten Toluidine sind erstmalig durch Philipp Ellinger (1920) im Hinblick auf ihre Blutwirkung studiert worden[5]. Ellinger untersuchte den Einfluß der Toluidine und des Anilins auf die Atmung der Gänseerythrozyten. Er fand, daß die Toluidine die Atmung der Erythrozyten sämtlich stärker hemmen als Anilin, wobei er die Atmungshemmung als Ausdruck einer Hb(3)-Bildung wertete.

Methodik.

Die Versuche wurden an Katzen vorgenommen. Zur Feststellung des zeitlichen Ablaufes der Hb(3)-Bildung wurde ihnen alle halbe Stunde aus der Ohrvene Blut entnommen und darin das Hb(3) nach der Zyanidmethode[6] bestimmt. Gleichzeitig wurden Ausstriche angefertigt, die mit Brillantkresylblau vital gefärbt wurden zur Darstellung von Heinz-Körperchen, auf die jeweils 200 Erythrozyten ausgezählt wurden.

*) Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden einen Teil der Dissertation von Leusser (München 1951). Die Versuche wurden 1949 durchgeführt.

Die verwendeten drei isomeren Toluidine stammten von der Firma Merck. o- und m-Toluidin wurden als 1 und 10%ige Lösungen in Maiskeimöl, das schlechter lösliche p-Toluidin als 2%ige Lösung den Katzen intraperitoneal gespritzt.

Zum Vergleich der Wirkungsstärke (KIESE[7]) der einzelnen Substanzen diente die maximale Erhöhung der Hb(3)-Konzentration (die Differenz zwischen Hb(3)-Ausgangswert und höchstem gemessenen Hb(3)-Wert), die in Äquivalenten Hb(3) zur verwendeten Menge Hb(3)-bildender Substanz in Mol in Beziehung gesetzt wurde (Annahme: 1 kg Tier = 75 ml Blut). Das so erhaltene Dosiswirkungsverhältnis (D.W.V.) stellt ein relatives Maß der Wirksamkeit der Substanzen dar, und ist nicht etwa eine absolute Zahl, die den tatsächlichen Umsatz zwischen Substanzmolekül und Hämoglobin angibt. Diese Zahl liegt wesentlich höher.

Ergebnisse.

Die höchsten gemessenen Hb(3)-Werte bei den verschiedenen Dosierungen der einzelnen Toluidine sind in der Tab. 1 aufgeführt. Die Werte bei den einzelnen Dosierungen zeigen zum Teil eine beträchtliche Streuung. Die Tiere reagierten vor allem bei den höheren Dosen sehr verschieden. Auch verhielten sich die gleichen Katzen bei zweimaliger Verabfolgung derselben Dosis nicht immer gleichartig. Es ist möglich, daß dafür außer individuellen Unterschieden in der Hb(3)-Bildung auch veränderte Resorptionsverhältnisse von Bedeutung sind.

Die Dosiswirkungsverhältnisse sinken bei den höheren Konzentrationen besonders oberhalb von 30 mg/kg stark ab. Für die berechneten mittleren D.W.V. wurden die Dosen 50—80 mg/kg daher nicht mehr berücksichtigt. Die D.W.V. betragen für o-Toluidin 1,78 $\pm$ 0,15, für m-Toluidin 1,20 $\pm$ 0,16 und für p-Toluidin 0,88 $\pm$ 0,10.

Die Unterschiede zwischen den D.W.V. von o- und p-Toluidin sowie zwischen o- und m-Toluidin sind signifikant ($k = 5{,}2$ bzw. 2,7), während der Unterschied zwischen den Wirkungsstärken von m- und p-Toluidin statistisch unsicher ist ($k = 1{,}8$).

Ein charakteristischer Unterschied in der Verlaufsform der Hb(3)-Bildung bei den drei isomeren Toluidinen bestand nicht. Die Hb(3)-Bildung stieg bei allen Isomeren verhältnismäßig rasch an, wobei das Maximum bei Dosen von 1—10 mg/kg zwischen 30 min und 2 Std erreicht war und bei den Dosen 15—30 mg/kg zwischen 1 und 4 Std. Während bei Dosen bis zu 20 mg/kg der Hb(3)-Gehalt sich innerhalb von 8 Std zurückbildete, verlief die Rückbildung bei höheren Dosen langsamer und dauerte bei 80 mg/kg bis zu 2 Tagen.

Ebenfalls gleichartig verhielten sich die drei Isomeren in bezug auf die HEINZ-Körperchen-Bildung. Die Dosis von 2 mg/kg bewirkte in der Regel eine HEINZ-Körperchen-Bildung in 10% der Erythrozyten, bei 80 mg/kg wurden bis zu 70% HEINZ-Körperchen tragende Erythrozyten gezählt. Die HEINZ-Körperchen waren wesentlich länger nachzuweisen als die Erhöhung des Hb(3)- Spiegels.

Bei allen drei Toluidinen zeigten die Tiere außer einer verstärkten Lungenatmung bei hohen Hb(3)-Konzentrationen motorische Unruhe, die bei höheren Dosierungen in Erschlaffung und Tonusverlust der

Muskulatur überging bei weitgestellter Pupille. Die Tiere wurden schließlich somnolent, erbrachen, hatten Urinabgang und eine oft starke Salivation. Diese Symptome waren beim p-Toluidin am ausgeprägtesten, bei dem auch die meisten letalen Ausgänge beobachtet wurden. Von 8 Tieren starben durch p-Toluidin 5, während beim o-Toluidin von 5 Tieren keines starb (siehe Tab. 1).

Tabelle 1. *Maximale Hämiglobinbildung durch o-, m-, p-Toluidin in Abhängigkeit von der Dosis.*

Dosis in mg/kg	o-Toluidin		m-Toluidin		p-Toluidin	
	g% Hb (3)	D.W.V.	g% Hb (3)	D.W.V.	g% Hb (3)	D.W.V.
1	0,5	2,51	0,5	2,51	0,2	1,0
	0,5	2,51	0,5	2,51		
2	0,9	2,26	0,6	1,50	0,6	1,5
			0,8	2,0		
5	1,4	1,40	0,6	0,60	1,0	1,00
	1,8	1,80	1,2	1,20		
8	2,7	1,7	0,9	0,56		
10	3,6	1,81	1,8	0,90	0,7	0,35
	4,7	2,35	2,2	1,10	2,0	1,00
	5,5	2,76				
15	2,3	0,77	3,1	1,04	2,4	0,80
	5,9	1,97			3,8	1,27
20	3,1	0,78	3,5	0,88	1,0	0,25
	5,1	1,27	4,7	1,18	3,1	0,78
	8,6	2,16				
	9,7	2,42				
25					3,9	0,78
					4,1	0,82
30	5,7	0,96	2,5	0,42	4,0*	0,67
	7,8	1,31	3,8	0,63	7,0	1,17
	7,9	1,32	4,0	0,67		
			5,8	0,97		
			10,1	1,67		
50	5,1	0,51	5,3	0,53	3,7*	0,37
	8,0	0,80	6,0	0,60	7,3*	0,73
80	5,4	0,34	5,3	0,33	6,0*	0,38
	5,4	0,34	8,9*	0,55	6,5*	0,41
	7,4	0,46				
Mittleres D.W.V. (1—30 mg/kg)		1,78±0,15		1,20±0,16		0,88±0,10

* Tier starb am Ende des Versuches.

Über die Wirkungsstärke des Anilins sind in der Literatur verschiedene Angaben enthalten. 1938 veröffentlichte G. Schwedtke[8] eine Anzahl von Versuchen über die Hb(3)-Bildung durch Anilin. Aus seinen Daten errechnet sich bei den Dosen von 2—30 mg/kg aus 19 Versuchen (unter Fortlassung eines Versuches mit ganz extrem

hohem Wert) ein D.W.V. von 2,5. Jung gibt das D.W.V. von Anilin auch mit 2,5 an[9] und bezieht sich damit auf unveröffentlichte Versuche von Herken. Aus den Ergebnissen von S. S. Spicer[10], der ebenfalls an Katzen die Hb(3)-Bildung durch Anilin untersuchte (7 Versuche mit 15 mg/kg) errechnet sich ein D.W.V. von 2,2. Das stimmt mit dem aus den Angaben von Schwedtke errechneten D.W.V. befriedigend überein, da das D.W.V. bei Anilinkonzentrationen unter 15 mg/kg größer ist. Wir legten unseren Vergleichen das aus Schwedtkes Versuchen entnommene D.W.V. des Anilins von 2,5 zugrunde, da es aus Untersuchungen mit annähernd den gleichen molaren Konzentrationen gewonnen wurde, die wir in unseren Toluidinversuchen anwendeten.

Diskussion.

Die Hämiglobin-(Methämoglobin = Hb(3))-bildende Wirksamkeit des Anilins wird durch Methylsubstitution in o-, m- und p-Stellung um 28, 52 bzw. 65 % vermindert. Diese Wirkungsverminderung entspricht in der Größenordnung der Wirkungsverminderung, die Phenylhydroxylamin durch entsprechende Methylsubstitution erfährt (Tab. 2). Lediglich die Verhältniszahlen von p-Methylphenylhydroxylamin und p-Methylanilin mit 25 bzw. 65 % liegen weiter auseinander.

Doch ist dabei zu berücksichtigen, daß das von Schlimme[3] angegebene D.W.V. von p-Methylphenylhydroxylamin aus nur 4 Versuchen gewonnen wurde, die ziemlich divergierende Resultate ergaben und für eine den statistischen Anforderungen genügende Festlegung des D.W.V. dieser Substanz nicht ausreichen. Man wird also in der Beurteilung des Unterschiedes der relativen Wirksamkeit der beiden in para-Stellung substituierten Substanzen vorsichtig sein müssen.

Tabelle 2. *Einfluß der Methylsubstitution auf die maximale Hämiglobinbildung durch Nitrobenzol, Phenylhydroxylamin und Anilin*

(Werte der Nitrotoluole nach M. v. Bredow und Jung[2], der Phenylhydroxylreihe nach H. Schlimme[3]).

Methylsubstitution	Nitrobenzol		Phenylhydroxylamin		Anilin	
	D.W.V.	Relative Wirksamkeit in %	D.W.V.	Relative Wirksamkeit in %	D.W.V.	Relative Wirksamkeit in %
	0,86	100	28	100	2,5	100
ortho	0,05	6	19	68	1,8	72
meta	0,04	5	18	64	1,2	48
para	0,00	0	21	75	0,88	35

Völlig anders liegen, wie aus der Tab. 2 ersichtlich ist, die Verhältnisse in der Nitrobenzolreihe. Hier führt die Methylsubstitution in o- und m-Stellung zu einer Verminderung der Hb(3)-bildenden Wirksamkeit des Nitrobenzols um 95 % und die Verbindung mit der Methylgruppe in para-Stellung bildet überhaupt kein Hb(3) mehr.

Schlimme hat bereits in ihrer Arbeit über die methylierten Phenylhydroxylamine ihre Ergebnisse den von M. v. Bredow und Jung bei den methylierten Nitrobenzolen erhobenen Befunden gegenübergestellt. Sie zog aus der unter-

schiedlichen Beeinflussung der Hb(3)-bildenden Wirksamkeit des Nitrobenzols und des Phenylhydroxylamins durch Methylierung den Schluß, daß durch die Methylsubstitution des Nitrobenzols die Reduktion der Nitrogruppe und damit die Entstehung des eigentlichen Hb(3)-Bildners entscheidend gehemmt wird.

Bezüglich des Anilins läßt sich aus unseren Befunden ableiten, daß die Oxydation der Aminogruppe in die reaktionsfähige Form durch die Methylsubstitution, zumindest in o- und m-Stellung, kaum beeinflußt wird.

Ist die Oxydation der Amino- zur Hydroxylamingruppe durch die Methylierung des Anilins nicht gehemmt, so kann die Wirkungsverminderung durch die Methylgruppe nur zustande kommen durch einen hemmenden Einfluß auf die direkt mit der Hb(3)-Bildung verbundenen Reaktionen des Phenylhydroxylamins. Dies ist einmal die weitere Oxydation des Phenylhydroxylamins und die daran gekoppelte Oxydation des Hämoglobins zu Hb(3) und zweitens die für die katalytische Wirkung des Phenylhydroxylamins notwendige Rückreduktion seines Oxydationsproduktes. Dabei ist es für diese Betrachtung gleichgültig, ob die mit der Hb(3)-Bildung verbundene Oxydation des Phenylhydroxylamins bis zum Nitrosobenzol erfolgt oder nur bis zu einem zwischen beiden Substanzen liegenden Radikal.

Da anzunehmen ist, daß die Oxydation der Amino- zur Hydroxylamingruppe durch eine Methylsubstitution am Benzolring nicht beeinflußt wird, ist zunächst nicht einzusehen, warum die weitere Oxydation der Hydroxylamingruppe durch die Methylierung gehemmt werden soll. In Analogie zum hemmenden Einfluß der Methylgruppe auf die Reduktion der Nitrogruppe des Nitrotoluols wäre daher eher anzunehmen, daß die Rückreduktion zum Phenylhydroxylamin durch die Methylsubstitution gehemmt wird. An dieser Rückreduktion des Oxydationsproduktes des Phenylhydroxylamins sind, wie Kiese[11] gezeigt hat, normale enzymatische Prozesse des Glukoseabbaus in den roten Zellen beteiligt. Eine Hemmung des Glukosestoffwechsels würde daher die Bereitstellung von neuem Phenylhydroxylamin und damit die Hb(3)-Bildung beeinträchtigen.

Aus den Untersuchungen von Ellinger über die Beeinflussung der Atmung von Gänseblutkörperchen durch Anilin und die drei isomeren Toluidine[5] geht hervor, daß die methylierten Aniline den Stoffwechsel der roten Zellen erheblich stärker hemmen als das Anilin selbst. Ellinger fand bei einer Konzentration von 0,05% Toluidin (was bei unseren Versuchen einer Dosierung von etwa 37 mg/kg entspricht) nach der zweiten Stunde durch die para-Verbindung eine Atmungshemmung von 25%, durch m-Toluidin eine solche von 22% und bei o-Toluidin eine Hemmung von 11%, während Anilin bei der 5fach höheren Konzentration unter sonst gleichen Bedingungen die Atmung der Erythrozyten

um nur 6 % hemmte. Die Reihenfolge dieser Substanzen hinsichtlich der von Ellinger gefundenen atmungshemmenden Wirkung: p-, m-, o-Toluidin-Anilin ist genau umgekehrt wie die von uns gefundene Reihenfolge der Hb(3)-bildenden Wirksamkeit dieser Stoffe.

Ellinger wertete die von ihm beobachtete Atmungshemmung der Gänseerythrozyten durch Anilin und die Toluidine als Maß der Hb(3)-Bildung und kam deshalb zu dem Schluß, die Toluidine seien stärkere Hb(3)-Bildner als das Anilin. Tatsächlich maß er aber nicht die Hb(3)-Bildung sondern die Atmung der Erythrozyten. „Wegen der starken Allgemeintoxizität" der Toluidine unterließ er es, auch das Sauerstoffbindungsvermögen nach Vergiftungen in vivo zu bestimmen, wie er es bei seinen Untersuchungen über die Hb(3)-Bildung durch Acetanilid getan hatte.

Ergibt sich aus unseren Befunden im Gegensatz zur Annahme von Ellinger, daß die Hb(3)-Bildung durch die Toluidine in der Reihenfolge: o-, m-, p-Toluidin abnimmt, so stimmen jedoch unsere Beobachtungen über die umgekehrte Reihenfolge dieser Stoffe hinsichtlich ihrer Allgemeintoxizität mit den Ergebnissen seiner Atmungsversuche überein.

Das zeigt sich bei unseren Protokollen am sinnfälligsten durch die Zahl der bei den einzelnen Substanzen im Versuch gestorbenen Tiere. Bei dem schwächsten Hb(3)-Bildner der Reihe, dem p-Toluidin starben von 8 Katzen am Ende des Versuches 5 (teilweise am nächsten oder übernächsten Tag, jedenfalls deutlich nach Überschreitung des Hb(3)-Gipfels und ohne direkten Zusammenhang mit der Hb(3)-Bildung), während durch m-Toluidin von 4 Katzen nur 1, und durch o-Toluidin, das bezüglich seiner Hb(3)-Bildung dem Anilin am nächsten steht, von 5 Katzen keine starb.

Zusammenfassung.

Es wurde die Hämiglobinbildung durch die drei isomeren Toluidine an Katzen untersucht. Die Wirkungsstärke wurde berechnet aus der maximalen Hb(3)-Bildung im Dosisbereich 1—30 mg/kg Toluidin. Die so erhaltenen Dosiswirkungsverhältnisse sind für o-, m- und p-Toluidin: 1,78; 1,20 und 0,88, während Anilin im gleichen Dosisbereich ein D.W.V. von 2,5 hat.

Die Toluidine verhalten sich in ihrer Wirkungsstärke zum Anilin ähnlich wie die Tolylhydroxylamine zum Phenylhydroxylamin. Es ist daher anzunehmen, daß (im Gegensatz zu der Reduktion der Nitrobenzole) durch die Methylsubstitution am Benzolkern des Anilins die Umbildung der Aminogruppe in die reaktionsfähige Hydroxylamingruppe *nicht* gehemmt wird.

Die Toluidine erweisen sich in umgekehrter Reihenfolge zu ihrer Hb(3) bildenden Wirksamkeit zunehmend toxisch.

Literatur.

[1] Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — [2] von Bredow, M., u. F. Jung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 335 (1942). — [3] Schlimme, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **202**, 60 (1943). — [4] Reiter, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 327 (1948). — [5] Ellinger, Ph.: Z. physiol. Chem. **111**, 86 (1920). — [6] Havemann, Jung u. von Issekutz: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [7] Kiese, M.: Klin. Wschr. **24/25**, 453 (1947). — [8] Schwedtke, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 121 (1938). — [9] Jung, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 133 (1947). — [10] Spicer, S. S.: J. of Pharmacol. **99**, 185 (1950). — [11] Kiese, M., D. Reinwein u. H. D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 393 (1950).

Dr. Melchior Reiter, München 15, Nußbaumstr. 28,
Pharmakologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 165—173 (1952).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer), aus der Inneren Abteilung (Chefarzt: Prof. Dr. H. Hahn) und aus dem Zentrallabor des Städt. Krankenhauses Mannheim (Leiter: Priv.-Doz. Dr. Hj. Staudinger).

Getrennte Bestimmung der 11-Oxy- und 11-Desoxycorticoide.

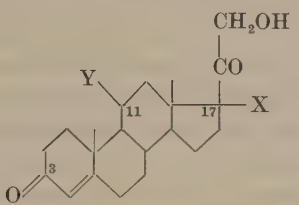
(Methode und einige Ergebnisse.)

Von
K. H. Pfeffer, W. Ruppel, Hj. Staudinger und L. Weissbecker.

(Eingegangen am 30. August 1951.)

Einleitung.

Die Konstitution der in den Nebennierenrinden vorkommenden wirksamen Hormone ist im wesentlichen durch Reichstein[1, 2] und Kendall[3] aufgeklärt worden.



		x	y
11-Oxycorticoide	Corticosteron (Comp. B)	H	OH
	11-Dehydrocorticosteron (Comp. A)	H	O
	17-Oxycorticosteron (Comp. F)	OH	OH
	11-Dehydro-17-Oxycorticosteron (Comp. E, Cortison)	OH	O
11-Desoxycorticoide	11-Desoxy-17-Oxycorticosteron	OH	H
	11-Desoxycorticosteron (DOC)	H	H

Es sind 6 Hormone der Nebennierenrinde bekannt, denen allen die ungesättigte Ketogruppe am C 3-Atom und die Ketoalkoholseitenkette am C 17-Atom des Steringerüstes gemeinsam ist. Das Vorhandensein dieser Gruppierung ist Voraussetzung für die physiologische Wirkung dieser Stoffe. Sie unterscheiden sich aber durch die Substitution am C 11- und C 17-Atom, wie das die angeführte Aufstellung zeigt.

Zunächst war man der Meinung — einige Forscher vertreten diesen Standpunkt noch heute[4, 5] — daß die 6 Hormone grundsätzlich gleichartig wirken, daß sie sich nur in quantitativer Hinsicht in ihrer Wirksamkeit unterscheiden. Diese „unitaristische" Auffassung von der Wirkung der Nebennierenrindenhormone ist vor allem auf Grund zahlreicher amerikanischer Arbeiten zugunsten einer „dualistischen" fast allgemein verlassen worden. Diese läßt sich etwas summarisch etwa

wie folgt zusammenfassen: Während die 11-Desoxycorticoide in erster Linie auf den Wasser- und Mineralhaushalt des Organismus wirken, weshalb sie auch „*Mineralocorticoide*" genannt werden, haben die 11-Oxycorticoide in erster Linie eine Wirkung auf den Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel. Der Name „*Glucocorticoide*" hierfür ist deshalb nicht ganz glücklich. (Da hier auf die vielen Einzelarbeiten, auf denen die kurzgefaßte Aussage beruht, nicht eingegangen werden kann, sei auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen: [6, 7, 8, 9, 10].)

Es schien eine Zeitlang sehr fraglich, ob die 11-Desoxycorticoide überhaupt eine physiologische Rolle spielten. Durch die neueren Untersuchungen von Pincus[7, 11] ist aber sichergestellt, daß die normale Nebennierenrinde nicht nur 11-Desoxycorticosteron und 11-Desoxy-17-Oxycorticosteron enthält, wie das schon von Reichstein gezeigt worden war, sondern daß sie diese Hormone auch ins Blut abgibt. Da andererseits das ganze Gebäude Selyes[12] auf dieser Voraussetzung beruht, schien es uns wichtig zu sein, eine Methode zur Verfügung zu haben, die es gestattet, diese Hormone getrennt und quantitativ zu bestimmen. Wie wir bereits in einer kurzen Notiz mitgeteilt haben, ist diese getrennte Bestimmung möglich[13]. Hier soll nun über die experimentellen Grundlagen, die genaue Arbeitsweise und einige damit erzielte Ergebnisse berichtet werden.

Alle Methoden zur quantitativen Bestimmung der Corticoide beruhen auf der Erfassung der für diese Hormone charakteristischen $CO \cdot CH_2OH$-Gruppe am C 17-Atom des Sterinskeletts (vgl. Heard und Sobel[14], Talbot u. Mitarb.[15], Staudinger und Schmeisser[16, 17], Corcoran und Page[18], Sprechler[19]). Nach unseren bisherigen Erfahrungen scheint uns die Methode von M. Sprechler und unsere eigene am geeignetsten für die routinemäßige Bestimmung der Harncorticoide zu sein, da sie spezifischer und doch vergleichsweise einfacher sind als die anderen Methoden. Da wir über die meiste Erfahrung mit unserer Methode verfügen, haben wir sie auch für die getrennte Bestimmung der 11-Desoxy- und 11-Oxycorticoide zugrunde gelegt.

Es ist schon von amerikanischen Autoren wiederholt versucht worden, die 11-Oxy- und 11-Desoxycorticoide getrennt zu bestimmen, indem deren unterschiedliche Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln ausgenützt wurde (Pincus[20], Daughaday, Jaffe und Williams[21]). Pincus und andere Autoren kamen aber zu dem Ergebnis, daß diese getrennte Bestimmung keinen Sinn habe, da in der Fraktion der „Mineralcorticoide" von ihnen offenbar unspezifische Verunreinigungen miterfaßt wurden.

Abgesehen von diesen chemischen Gruppenbestimmungen der Corticoide, bei denen physiologisch unwirksame Reduktionsprodukte des Corticoidstoffwechsels, z. B. Steroide ohne die $\alpha\beta$- ungesättigte Ketogruppe am C 3-Atom, aber mit der Ketoalkoholseitenkette am C 17-Atom miterfaßt werden, kann man heute die Hormone der Nebennierenrinde

auch durch Papierchromatographie trennen und so einzeln quantitativ und spezifisch bestimmen[22, 23, 24].

Die Verteilungsquotienten der Hormone*.

Die Möglichkeit zu einer getrennten Bestimmung der Gluco- und Mineralocorticoide beruht auf ihrer verschiedenen Löslichkeit in Wasser, bzw. einem stark lipophilen Lösungsmittel.

Wie bereits aus den Arbeiten von Reichstein[1, 2], Kendall[3] u. a. hervorgeht und wie es auch zu erwarten ist, sind die Hormone der Nebennierenrinde um so leichter wasserlöslich, je mehr Sauerstoffgruppen sie tragen. Aus Gründen der Zweckmäßigkeit wählten wir für die Trennung der Hormone das System Wasser-Petroläther, da diese Lösungsmittel ohnehin in dem von uns benutzten Analysengang gebraucht werden. Von den uns zur Verfügung stehenden reinen Hormonen: Desoxycorticosteron**, Corticosteron**, 11-Desoxy-17-Oxycorticosteron**, 11-Dehydro-17-Oxycorticosteron** haben wir jeweils 0,2 mg zwischen 30 cm³ Wasser und 30 cm³ reinstem Petroläther verteilt. Die wäßrige Schicht wurde dann mit Chloroform extrahiert. Alle 6 Hormone der Nebennierenrinde sind gut in Chloroform löslich und es gelingt leicht, auch die relativ gut wasserlöslichen Hormone, wie das 11-Dehydro-17-Oxycorticosteron quantitativ aus wäßriger Phase mit Chloroform zu extrahieren. Der nach der Verteilung im Petroläther verbliebene Teil der Hormone kann dann mit 70%igem Alkohol aus diesem nach Verdünnen mit Wasser wiederum mit Chloroform extrahiert werden. Die Bestimmung des wasser- und petrolätherlösten Hormonanteils geschieht dann nach den bekannten Verfahren[17].

Auf diese Weise haben wir die Verteilung der 4 genannten Reinhormone zwischen *gleichen* Mengen Petroläther und Wasser bestimmt. Das Ergebnis ist in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 1.

Substanz	Wasser %	Petroläther %
Desoxycorticosteron	10 ± 5	90 ± 5
11-Desoxy-17-Oxycorticosteron . . .	25 ± 5	75 ± 5
Corticosteron	80 ± 10	20 ± 10
11-Dehydro-17-Oxycorticosteron . .	90 ± 5	10 ± 5

Die Einführung eines Sauerstoffs — sei es als Hydroxyl, sei es als Ketogruppe — am C 11-Atom des Sterinskelettes vergrößert die Wasserlöslichkeit bedeutend, während die Hydroxylgruppe am C 17-Atom einen geringeren Einfluß auf die Wasserlöslichkeit hat. Wir meinen, daß das von der verschiedenen räumlichen Verteilung der hydrophilen Gruppen in den beiden Beispielen herrührt. Die zusätzliche Hydroxylgruppe an dem ohnehin stark hydrophilen Teil des Moleküls am C 17-Atom hat auf das physikalische Verhalten des ganzen Moleküls einen geringeren Einfluß,

* Wir danken Frl. V. Bauer, Zentrallabor des Städt. Krankenhauses Mannheim, und Frl. G. Schmidlin, Med.Univ.-Klinik Freiburg, für die zuverlässige und tüchtige Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

** Den Herren Prof. Dr. Reichstein, Basel, Dr. G. Pincus, Shrewsbury, der Ciba A. G., Wehr/Baden und der Schering A. G., Berlin, danken wir für die liebenswürdige Überlassung von einigen Milligramm der kostbaren Substanzen.

als wenn die hydrophile Gruppe neu an einen sonst hydrophoben Teil des Moleküls auftaucht.

Auf diesem Befund beruht also die Möglichkeit, die beiden 11-Desoxycorticoide — das sind die „Mineralocorticoide" — von den vier 11-Oxy- bzw. Oxo-corticoiden, d. h. den „Glucocorticoiden" zu trennen. Wir dürfen unserer Meinung nach von den zwei nicht geprüften „Glucocorticoiden", nämlich dem 11-Dehydrocorticosteron und dem 17-Oxycorticosteron eine ähnliche Löslichkeit wie für das Corticosteron bzw. 11-Dehydro-17-Oxycorticosteron annehmen. Wir wollen auch diese beiden Hormone noch auf ihre Verteilung im System Wasser-Petroläther prüfen, sowie sie uns zugänglich geworden sind. In der praktischen Durchführung der Trennung wird durch zweimaliges Ausschütteln des Petroläthers mit dem 1/4 Volumen Wasser und Zurückschütteln des Wassers mit Petroläther die Trennung noch besser gestaltet, als dies bei einmaliger Verteilung der Fall ist.

Einige Ergebnisse und Anwendungen des neuen Verfahrens.

Es erhebt sich die Frage, ob denn in der Anwendung des an Gemischen mit den reinen Hormonen erprobten Verfahrens, bei der Analyse von Harnen brauchbare Ergebnisse erhalten werden.

Hierzu sei gleich mit Deutlichkeit betont, daß wir uns voll im klaren sind darüber, daß die Erfassung des wasserlöslichen und petrolätherlöslichen Anteils der Harncorticoide nicht identisch ist mit der Bestimmung der biologisch aktiven „Glucocorticoide" und „Mineralocorticoide". Wenn wir uns gelegentlich der Einfachheit halber dieser summarischen Ausdrücke bedienen, so wissen wir genau, daß mit unserer Methode ganze Gruppen von verschiedenen Corticoiden bestimmt werden, in denen die biologisch aktiven Hormone nur etwa 10% ausmachen. Wir glauben aber aus der Erfahrung an zahlreichen Fällen und klinischen Experimenten schließen zu dürfen, daß in der Tat in dem wasserlöslichen Corticoidanteil Stoffwechselprodukte der 11-Oxycorticoide — in dem petrolätherlöslichen Anteil entsprechende Derivate der 11-Desoxycorticoide — erfaßt werden.

Es bedarf kaum einer Erwähnung, daß wir, bevor wir die eigentlichen Harnbestimmungen durchführten, Harnen die obengenannten Reinhormone in bekannter Menge zugefügt haben, und daß wir diese Hormone je nach ihrer Konstitution mit etwa 85—105% in dem petroläther- bzw. wasserlöslichen Anteil wiedergefunden haben. Ein Beispiel für mehrere solcher Bestimmungen zeigt Tab. 2.

Tabelle 2.

Vorgegeben	Mineralocorticoide	Glucocorticoide
Harn normal vom Mann	125 γ	560 γ
100 γ DOCA	210 γ	570 γ
100 γ 11-Dehydro-17-Oxy-corticosteron	135 γ	645 γ
100 γ DOC + 100 γ 11-Dehydro-17-Oxycorticosteron	205 γ	655 γ

Zunächst haben wir an zahlreichen gesunden Männern im Alter von 25—50 Jahren die Normalwerte für die beiden Corticoidfraktionen bestimmt. Um wirkliche Normalwerte zu erhalten, dürfen die Versuchspersonen keinen außergewöhnlichen Belastungen ausgesetzt sein. Wir fanden bei 28 verschiedenen, gesunden Männern zum Teil in wiederholten Untersuchungen im Mittel folgende Werte

„Glucocorticoide" 550—680 γ
„Mineralocorticoide" 120—180 γ.

Bei Frauen dürften die Verhältnisse ähnlich liegen, doch schwankt die Corticoidausscheidung bei Frauen mit dem Zyklus, wie wir bereits früher mitgeteilt haben[17].

Über die Ergebnisse der getrennten Hormonbestimmung bei verschiedenen Erkrankungen und bei hormonalen Störungen, sowie unter besonderen Verhältnissen des Streß usw. haben wir bereits anderenorts berichtet[25, 26, 27, 28, 29, 36].

Hier sei nur, um die Brauchbarkeit der Methode zu zeigen, und um klarzustellen, daß die mit ihr erzielten Ergebnisse „sinnvoll" sind, auf folgende Befunde hingewiesen:

1. Nach Zufuhr von täglich 100 mg Cortison steigt die Ausscheidung der Glucocorticoide individuell verschieden von normal etwa 600 γ auf 900—1200 γ. Die Mineralocorticoide werden kaum beeinflußt[25].

2. Nach Gaben von ACTH steigt nur die Ausscheidung von Glucocorticoiden[25, 28].

3. Nach einem Streß, z. B. nach körperlicher Arbeit, aber auch nach Pyrifer-Gaben steigt nur oder fast nur die Ausscheidung der Glucocorticoide an, während die Mineralocorticoide kaum oder gar nicht vermehrt ausgeschieden werden[28].

4. Bei vielen Fällen von Polyarthritis rheumatica findet sich bei normaler oder erniedrigter Gesamtcorticoidausscheidung eine deutliche Verschiebung zugunsten der Mineralocorticoide[26, 30, 31, 36].

5. Bei Patienten mit Morbus Addison steigt nach Gaben von Desoxycorticosteron die Ausscheidung der Mineralocorticoide stark an. Glucocorticoide werden dagegen bei einem voll entwickelten Morbus Addison kaum ausgeschieden[31].

Nachdem uns so in vielen Untersuchungen und in vielen verschiedenen Fällen die Brauchbarkeit der Methode grundsätzlich geklärt scheint, glauben wir auch folgende Befunde, die unter Anwendung dieser Methode erhoben wurden, verwerten zu dürfen:

6. Spritzt man einer gesunden Versuchsperson Desoxycorticosteron, so findet man im Harn nicht wie ursprünglich erwartet, hauptsächlich eine vermehrte Ausscheidung von Mineralocorticoiden, sondern die Fraktion der „Glucocorticoide", also der „11-Oxycorticoide" tritt vermehrt in Erscheinung. Z. B.: Nach 10 mg Percorten i. m. findet man, statt wie vor dem Versuch 580 γ Gluco- und 145 γ Mineralocorticoide, nun 980 γ Gluco- und 310 γ Mineralocorticoide[30, 31]. Damit scheint auch für den gesunden Menschen die Umwandlung der 11-Desoxy- in 11-Oxycorticoide möglich zu sein, wie das Pincus an der perfundierten Nebenniere bereits zeigen konnte[7, 11]. Daß auch beim gesunden Menschen der Ort der Umwandlung die Nebennierenrinde ist, geht aus den oben erwähnten Befunden bei Patienten mit Morbus Addison hervor.

7. Spritzt man Patienten mit einer chronischen Polyarthritis rheumatica Desoxycorticosteron, so findet man bei manchen — nicht bei allen — eine vermehrte Ausscheidung, vor allem der „Mineralo"- und nicht wie bei Gesunden der „Glucocorticoide". Die Nebennieren dieser Patienten haben also die Fähigkeit, die 11-Desoxy- in 11-Oxysteroide umzuwandeln, verloren[30, 31]. Ob diese Beobachtung etwas mit der Ätiologie der Erkrankung zu tun hat, wagen wir noch nicht zu entscheiden.

Diskussion.

Aus den beschriebenen experimentellen Untersuchungen über die Verteilung der reinen Nebennierenrindenhormone, und über die Auftrennung künstlich hergestellter „Harnmodelle" geht hervor, daß die annähernde Trennung der gesamten im Harn ausgeschiedenen Corticoide in 11-Oxycorticoide (Glucocorticoide) und 11-Desoxycorticoide (Mineralocorticoide) möglich ist. Wir sind uns darüber im klaren, daß die mit dem chemischen Nachweisverfahren bestimmten Corticoide nicht nur die hormonal aktiven 6 eingangs erwähnten Derivate des Δ 4 Pregnen 3,20-dion 21-ol umfaßt, sondern daß alle Steroidderivate erfaßt werden, sofern sie am C 17-Atom eine α-Ketolgruppe tragen, also auch Pregnan und Pregnen-3 ol-, Derivate, die biologisch inaktiv sind. Solche Verbindungen werden reichlich im Harn ausgeschieden. Sie sind Stoffwechselprodukte der ursprünglichen Nebennierenrindenhormone[32, 33, 34]. Insofern ist ihre Erfassung durch ein chemisches Bestimmungsverfahren durchaus sinnvoll. Sicherlich wäre es korrekter, wenn — wie gelegentlich vorgeschlagen wurde — bei den von uns bestimmten Fraktionen im Harn von „petroläther-leicht löslichen reduzierenden und alkaliempfindlichen Lipoiden" (kurz 11-Desoxycorticoide) und „petroläther-schwer-löslichen reduzierenden und alkaliempfindlichen Lipoiden" (kurz 11-Oxycorticoide) gesprochen würde, da wir ja nicht genau sagen können, welche Stoffe im einzelnen durch die von uns angewandte Gruppenreaktion erfaßt werden. So richtig dieser Einwand ist, so sehr wir uns auch grundsätzlich zu dieser Ansicht bekennen, so meinen wir doch, die kurze Ausdrucksweise „11-Oxy- und 11-Desoxycorticoide" benutzen zu dürfen, denn im wesentlichen sind die von uns bestimmten reduzierenden und alkaliempfindlichen Stoffe im Harn Corticoide, sofern wir darunter die Nebennierenrindenhormone *und* ihre Stoffwechselprodukte verstehen.

Die Frage, ob unser Vorgehen, den Harn bei p_H 4 zu extrahieren, oder das angelsächsische Verfahren der Extraktion des Harns bei p_H 1 richtiger ist, soll hier nicht erörtert werden. Wir werden in Kürze darüber experimentelles Material vorlegen, aus dem hervorgeht, daß die Extraktion bei p_H 4, wie wir sie üben, zu besser reproduzierbaren und besser begründeten Aussagen führt, als die Extraktion bei p_H 1[35].

Bereits in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß amerikanische Autoren die Bestimmung der Fraktion der wasser-schwer-löslichen

Corticoide (11-Desoxycorticoide) für sinnlos halten. Wir glauben mit den oben vorgelegten Befunden an Fällen aus der Klinik (z. B. DOC-Gaben bei Gesunden und Kranken) gezeigt zu haben, daß die getrennte Bestimmung der 11-Oxy- und 11-Desoxycorticoide zu reproduzierbaren, sinnvollen und wichtigen Ergebnissen führt. Wir sind nun dabei, diese mit der genannten Methode erzielten Ergebnisse durch papierchromatographische Untersuchungen zu erhärten[35].

Die wichtigsten Ergebnisse seien nochmals zusammengefaßt:

1. Der gesunde Mann scheidet etwa 550—680 γ 11-Oxy- und etwa 120—180 γ 11-Desoxycorticoide aus.

2. Viele Patienten mit chronischer Polyarthritis scheiden deutlich weniger 11-Oxycorticoide aus, die 11-Desoxycorticoide können dabei normal oder vermehrt ausgeschieden werden.

3. Gesunde Menschen wandeln parenteral zugeführtes 11-Desoxycorticosteron in 11-Oxycorticoide um.

4. Menschen mit Addisonscher Erkrankung können zugeführtes 11-Desoxycorticosteron nicht umwandeln, es erscheint — allerdings nur zu einem Bruchteil — als 11-Desoxycorticoid im Harn wieder.

5. Ebenso haben viele Patienten mit einer Polyarthritis rheumatica in mehr oder minder starkem Maße die Fähigkeit verloren, zugeführtes Desoxycorticosteron in 11-Oxysteroide umzuwandeln.

Zusammenfassung.

1. Die Verteilungskoeffizienten von 4 verschiedenen Nebennierenrindenhormonen in dem System Petroläther-Wasser wurden bestimmt.

2. Daraus wurde eine Methode zur Trennung der 11-Oxy- und 11-Desoxycorticoide entwickelt.

3. Einige grundsätzlich wichtige Ergebnisse, die mit dieser Methode in der Klinik erarbeitet werden konnten, werden bekanntgegeben.

Die Methode von Staudinger und Weissbecker.

500 cm³ eines 24-Std-Harnes werden mit Essigsäure angesäuert und im Scheidetrichter 5mal mit je 50 cm³ Chloroform sehr intensiv ausgeschüttelt. Die sich bildende schleimige Emulsion wird 20—30 min in der Zentrifuge (3000 U/min) zentrifugiert, das Chloroform im Scheidetrichter abgelassen. Der zurückbleibende Schleimpfropf wird noch 2mal mit je 10 cm³ Chloroform ausgewaschen. Die Chloroformlösung wird daraufhin 1mal mit 10 cm³ n NaOH und 1mal mit 10 cm³ H_2SO_4 kurz, aber intensiv geschüttelt. Die wäßrige Phase wird mit 10 cm³ Chloroform nachgewaschen. Daraufhin wird das Chloroform durch ein weiches Filter filtriert und in einer Schliffapparatur bei vermindertem Druck und bei einer Temperatur von höchstens 50° abdestilliert. Das Chloroform kann nach Reinigung wieder verwendet werden. Rückstand im Kolben bei 40° C in 40 cm³ Petroläther aufnehmen. Zu den 40 cm³ Petroläther werden in den Kolben 10 cm³ n/10 HCl zugegeben und intensiv geschüttelt. Danach in den Scheidetrichter überführen, n/10 HCl-Lösung ablassen. Der Kolbenrückstand wird nochmals mit 10 cm³ n/10 HCl gut ausgespült, diese Portion wird nochmals mit dem Petroläther im Scheidetrichter geschüttelt und mit

der ersten vereint. Zu diesen 20 cm³ n/10 HCl werden 20 cm³ 96%iger Alkohol hinzugefügt und nochmals mit 20 cm³ Petroläther ausgeschüttelt (wäßrige Lösung = sogenannte „Glucocorticoide). Die ersten 40 cm³ Petroläther werden nun 4mal mit je 10 cm³ 70%igen Alkohol (verdünnt mit n HCl) ausgeschüttelt, nachdem mit *jeder* dieser Alkoholportionen erst obiger Kolben nochmals gut ausgespült worden ist. Dann wird mit 20 cm³ n HCl verdünnt und nochmals mit 20 cm³ Petroläther ausgeschüttelt (wäßrige Phase = sogenannte „Mineralocorticoide"). Die „Gluco- und Mineralofraktionen", die nun also jede für sich in 50%iger alkoholischer Lösung vorliegen, werden 4mal mit je 10 cm³ Chloroform energisch ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformauszüge werden mit je 10 cm³ n/2 NaOH, n/10 NaOH und mit 10 cm³ H_2SO_4 zur Entfernung saurer und basischer Substanzen ausgeschüttelt.

Dann wird der Chloroformauszug durch 5 g Permutit (eventuell auch Blaugel), das sich in einem Chlorkalziumrohr von etwa 10 cm Länge und etwa 1 cm Weite befindet, filtriert. (Das Permutit wird vorher mit etwa 20 cm³ Chloroform kurz ausgewaschen, das Waschchloroform wird verworfen.) Nach dem Filtrieren wird mit etwa 20 cm³ Chloroform nachgewaschen. Die Chloroformlösung wird auf ein rundes Volumen (z. B. 60 cm³) aufgefüllt und in 2 genau gleiche Teile geteilt. Im 100 cm³-Schliffkölbchen wird das Chloroform bei vermindertem Druck und bei einer Temperatur von höchstens 50° im Wasserbad abdestilliert. In das eine Kölbchen gibt man *genau* 2 cm³ n/10 NaOH und erhitzt es 1 Std im kochenden Wasserbad am Rückflußkühler. Durch dieses Vorgehen wird das Nebennierenrindenhormon zerstört. Die Natronlauge wird daraufhin mit genau 2 cm³ n/10 Essigsäure neutralisiert und mit 1 Tropfen Essigsäure dann eben angesäuert. Unter Durchsaugen von filtrierter Luft wird im kochenden Wasserbad die Lösung zur Trockne gebracht. Das unbehandelte Kölbchen, das das unzerstörte Hormon enthält, und das Kölbchen mit dem zerstörten Hormon werden beide mit insgesamt 4 cm³ reinstem Eisessig in kleine Portionen ausgespült und die Eisessiglösung in 2 Jenaer Reagensgläser gegeben. Dazu gibt man unter gutem Schütteln je 0,5 cm³ des Molybdän-Phosphorsäurereagens, das frisch aus folgenden Lösungen bereitet wurde: Ein Teil Lösung A: 14 g MoO_3 (reinst, frei von NH_4- und Cl-Ionen), 8,0 g NaOH pa, 50 cm³ H_2O. 4 Teile Lösung B: 32 cm³ 85% H_3PO_4 (reinst), 18 cm³ H_2SO_4 pa, oder 30 cm³ 89% H_3PO_4 (reinst) und 20 cm³ 40% H_2SO_4 pa. Die Reagensgläser mit dem Eisessig und Reagens werden unter gelegentlichem Schütteln 1 Std im kochenden Wasserbad erhitzt, dann abgekühlt. Die Lösungen werden im Meßkölbchen auf genau 5 cm³ mit Eisessig aufgefüllt. Die Vergleichslösung mit dem zerstörten Hormon ist häufig etwas trüb, sie wird durch ein Blutzuckerfilter (Schleicher & Schüll Nr. 587 E) filtriert. Die beiden Lösungen werden im Stufenphotometer mit Filter S 72 in der 1 cm-Küvette gegeneinander photometriert. Falls die Lösungen zu dunkel sind, wähle man die 0,5 cm-Küvette (wobei jedoch das Resultat mit 2 multipliziert werden muß).

Um den Hormongehalt ausrechnen zu können, muß die Intensität der Blaufärbung von einer bekannten Menge Desoxycorticosteronazetat in Eisessig bestimmt werden. Für 100 γ Desoxycorticosteronazetat finden wir mit Filter S 72 in der 1 cm-Küvette eine Extinktion von 0,85. Der Wert muß aber für jedes Laboratorium und die jeweils verwendeten Reagenzien erst festgelegt werden. Die Extinktion der Urinextrakte muß mit 2 multipliziert werden, da ja die Hälfte des Hormons zerstört wurde. Das Ergebnis, das sich auf 500 cm³ Harn bezieht, wird auf dessen Tagesmenge umgerechnet.

Nach einem etwas vereinfachten Verfahren, das zu gleichwertigen Ergebnissen führt, kann man auch wie folgt arbeiten:

200 cm³ des angesäuerten 24-Std-Harns werden mit 5mal 30 cm³ Chloroform gut ausgeschüttelt. Zu dem Schleim gibt man spatelspitzenweise unter intensivstem Schütteln soviel reinste Tierkohle, bis sich die Emulsion gerade trennt (etwa 0,5 bis

1 g). Dann wird durch ein Papierfilter filtriert, der Kohlenrückstand mehrfach mit wenig Chloroform nachgewaschen. Das Chloroform wird dann bei vermindertem Druck abdestilliert. Dann wird weiter, wie beschrieben, gearbeitet. Da die Kohle sich erst mit dem Wasser und den den Schleim bildenden Stoffen belädt, ist der Verlust an Hormon wider Erwarten sehr gering, wie wir messend feststellen konnten.

Alle verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien müssen äußerst rein sein. Über Reinigung der Lösungsmittel, über die Störungen durch Verunreinigungen der Reagenzien und der Laborluft ist früher berichtet worden[16, 17]. Erneut sei auch hier darauf hingewiesen, daß die Gegenwart einer Vielzahl von Arzneimitteln die Bestimmung unmöglich macht (Morphin, Pyrazolon-Derivate, Istizin, Herzglykoside, Sulfonamide und viele andere mehr).

Die Empfindlichkeit dieser Methode gegenüber den vielfältigsten Störungen ist derart groß, daß zuverlässige Ergebnisse erst nach längerer Einarbeitung bei großer Laborerfahrung und exakter Einhaltung der Arbeitsbedingungen erzielt werden können.

Literatur.

[1] Reichstein, T.: Ergebnisse der Vitamin- u. Hormonforsch. **1**, 334 (1938). — [2] Reichstein, T.: Chimia **4**, 21, 47 (1950). — [3] Kendall, E. C.: Proc. Staff Meet Mayo Clinic **12**, 136 (1937). — Endocrinology **30**, 853 (1942). — [4] Verzár, F.: Die Funktion der Nebennierenrinde. Basel 1939. — [5] Verzár, F.: Schweiz. med. Wschr. **80**, 468 (1950). — [6] Pincus, G., u. K. Thiemann: The hormones 1948. — [7] Pincus, G., u. K. Thiemann: Adrenal Cortex: Transactions of the first Conference November 1949. — [8] Hartman, F. A., u. K. A. Brownell: The adrenal gland. Philadelphia 1949. — [9] Ingle, D. J.: J. clin. Endocrinol. **10**, 1312 (1950). — [10] Pfeffer, K. H., u. Hj. Staudinger: Angew. Chem. **63**, 321 (1951). — [11] Pincus, G.: Amer. J. of Med. Mai 1951. — [12] Selye, H.: „Streß" Acta Endocrinol. Montreal 1950. — [13] Weissbecker, L., u. Hj. Staudinger: Klin. Wschr. **29**, 59 (1951). — [14] Heard, R. D. H., u. H. Sobel: J. of biol. Chem. **165**, 687 (1946). — [15] Talbot, N. B., A. H. Saltzman, R. L. Wixom u. J. K. Wolfe: J. of biol. Chem. **160**, 535 (1945). — [16] Staudinger, Hj., u. M. Schmeisser: Z. physiol. Chem. **283**, 54 (1948). — [17] Staudinger, Hj., u. M. Schmeisser: Biochem. Z. **321**, 83 (1950). — [18] Corcoran, A. C., u. J. H. Page: J. Labor. a. clin. Med. **33**, 1326 (1948). — [19] Sprechler, M.: Acta Endocrinol. **4**, 205 (1950). — [20] Romanoff, L. P., u. G. Pincus: Endocrinology **45**, 10 (1949). — [21] Daughaday, W. H., H. Jaffe u. R. H. Williams: J. clin. Endocrinol. **8**, 166 (1948). — [22] Zaffaroni, A., R. B. Burton u. E. H. Keutmann: Science **111**, 6 (1950). — [23] Burton, R. B., A. Zaffaroni u. E. H. Keutmann: J. of biol. Chem. **188**, 763 (1951). — [24] Hofmann, H., u. Hj. Staudinger: Naturwiss. **38**, 213 (1951). — [25] Heilmeyer, L., J. Frey, L. Weissbecker, G. Buchegger, H. Kilchling u. H. Begemann: Dtsch. med. Wschr. **75**, 1124 (1950). — [26] Pfeffer, K. H., u. Hj. Staudinger: Klin. Wschr. **28**, 451 (1950). — [27] Pfeffer, K. H., u. Hj. Staudinger: Klin. Wschr. **29**, 201 (1951). — [28] Pfeffer, K. H., u. Hj. Staudinger: Klin. Wschr. **29**, 325 (1951). — [29] Frey, J.: Klin. Wschr. **29**, 262 (1951). — [30] Pfeffer, K. H., u. Hj. Staudinger: In Vorbereitung. — [31] Weissbecker, L., u. W. Ruppel: Verhdlg. dtsch. Intern. Kongr. 1951. — [32] Lieberman, S., u. K. Dobriner: aus G. Pincus: Recent progress in hormone research. Vol. III, 72 (1948). — [33] Heard, R. D. H.: aus G. Pincus, K. V. Thiemann: The hormones chemistry, physiology a. applications Vol. I, 1948. — [34] Mason, H. L.: aus G. Pincus: Recent progress in hormone research. Vol. III, 103 (1948). — [35] Staudinger, Hj.: in Vorbereitung. — [36] Weissbecker, L., u. W. Ruppel: Klin. Wschr. im Druck.

Priv.-Doz. Dr. Hj. Staudinger, Städt. Krankenhaus Mannheim.
Priv.-Doz. Dr. L. Weissbecker, Med. Univ.-Klinik Freiburg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 174—175 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Beitrag zur Untersuchung bromhaltiger Pharmaka.

Von

NORBERT HILLECKE.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 12. Juli 1951.)

I.

Anläßlich der Untersuchung eines bromhaltigen Sedativums[1] wurden die Möglichkeiten einer exakten Brombestimmung in Urin und Kot nachgeprüft.

Dabei erwies sich die titrimetrische Analyse nach LEIPERT[2] allen kolorimetrischen Methoden (unter der Nachprüfung mit dem lichtelektrischen Kolorimeter nach HAVEMANN[3]) als überlegen.

Doch mußte an der Originalapparatur die Vorlage (Gasabsorptionsgefäß) modifiziert werden. Mit der Originalvorlage, bei der die Jenaer G2-Fritte sich nach unten öffnet, ergab sich häufig ein Zusammenfließen der durch die kleinen Poren hindurchtretenden Gasperlen vor ihrer Ablösung, so daß ihr Durchmesser zu groß wurde, um während der Zeitdauer des Durchperlens allen Halogenmolekülen eine Berührung mit der Absorptionsflüssigkeit zu ermöglichen.

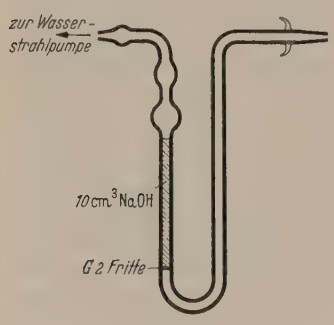


Abb. 1.

Abb. 1 zeigt die modifizierte Vorlage*, die aus einem Stück besteht, und so im Rahmen der Gesamtapparatur überdies einen Schliff erspart. Sie wird mit einer Pipette beschickt und durch gewaschene Druckluft entleert, in gleicher Weise auch ausgespült.

Über die mit der modifizierten Vorlage erreichte Genauigkeit der Brombestimmung unterrichtet Tab. 1.

II.

Bei meiner Untersuchung fand ich einen Einfluß des Futters auf die Bromausscheidung. Die Untersuchungen wurden an Ratten in Stoffwechselkäfigen vorgenommen. Es zeigte sich, daß innerhalb der ersten 5 Tage bei Getreidefütterung 40—50 %, bei Fleischfütterung aber 100 bis 105 % des applizierten organischen Broms vorwiegend im Urin wiedergefunden wurden. Daraufhin wurden Leerwertbestimmungen unter den gleichen Versuchsbedingungen, aber ohne Zufütterung von bromhaltigem Material durchgeführt. Ein Beispiel zeigt Tab. 2.

* Für die Anfertigung dieser Vorlage schulde ich Herrn MACHALET, Berlin-Dahlem, herzlichen Dank.

Man entnimmt aus ihr in Übereinstimmung mit den Werten der Zufütterungsversuche eine wesentlich höhere Bromausscheidung bei den mit Fleisch gefütterten Tieren.

Die Erklärung des größten Teils der Mehrausscheidung beim Leerversuch findet man darin, daß die Tiere mit gekochtem und leicht gesalzenem Fleisch ernährt wurden, welches etwa 1 % Kochsalz enthielt, das noch durch begleitende Bromide verunreinigt war.

Tabelle 1.

Verbindung	mg Brom		% Fehler
	berechnet	gefunden	
KBr	0,335	0,326	2,7
KBr	3,350	3,343	0,3
KBr	2,014	2,010	0,2
Tribroma* . .	6,887	6,790	1,4

* Tribromtrimethyl-acetamid $(BrCH_2)_3 \cdot C \cdot CONH_2$.

Der Verbrauch der Tiere betrug in den 5 Tagen 100 g Fleisch, d. h. 20 g/die. Rechnet man den im allgemeinen stark schwankenden Bromidgehalt des Kochsalzes mit nur 0,03 % (NaCl „Merck" mit Garantieschein enthält bis 0,01 %), so kommt man schon auf 0,3 mg Brom.

Tabelle 2.

Tier (Ratte)	Futter	Tage	mg Brom gefunden		Summe
			Urin	Kot	
G	Fleisch . . .	0.—2.	0,17	0,06	0,23
		2.—5.	0,31	0,08	0,39
					0,62
H	Getreide . .	0.—2.	0,05	0,03	0,08
		2.—5.	0,07	0,05	0,12
					0,20

Die accessorische Mehrausscheidung bei Zufütterung organischen Broms kann so erklärt werden, daß das mit dem Fleisch vermehrt zugeführte Kochsalz auf das vermutlich abgespaltene anorganische Brom, also Bromid, ausschwemmend wirkt.

Ein signifikanter Einfluß der Applikationsart (oral oder parenteral) auf die Bromausscheidung wurde nicht festgestellt.

Literatur.

[1] Hillecke, N.: Untersuchungen über ein bromhaltiges Säureamid, Inauguraldissertation. Freie Universität Berlin 1951. — [2] Leipert, Th., u. O. Watzlawek: Z. physik. Chem. **226**, 108 (1934). — [3] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939).

Dr. Norbert Hillecke, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 176—184 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. L. Lendle).

Über die Wirkungsweise von Magnesium im Gegensatz zu Curarin und Nicotin*.

Von

Clarissa von Hof und Hans-Helmut Schneider.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 10. August 1951.)

In der Behandlung von Tetanus, Tetanie und Erregungszuständen hat die Magnesiumnarkose durch Auffindung moderner Basisnarkotica an Wert verloren. Die Einführung von Curarin in die praktische Medizin hat jedoch neues Interesse für die Wirkungsweise peripher lähmender Stoffe geweckt und die Untersuchung der Erregungsübertragung am Nerv-muskelsystem angeregt. Dabei verdient auch das Magnesium Beachtung, dessen Angriffspunkte im übrigen noch nicht genügend geklärt sind, besonders im Hinblick auf den Anteil der peripheren oder zentralen Lähmung. Außerdem besitzt Magnesium lähmende Wirkungen an autonom innervierten Organen, z. B. am Darm, die vielleicht als eine direkte Muskellähmung (Spasmolyse) gedeutet werden können.

Neue Arbeiten (Stanbury) haben bei Gangliendurchströmung eine typische „Synapsenlähmung" durch Magnesium festgestellt. Es war nun im Hinblick auf die Synapsenwirkung, die ja auch im animalen Nervensystem die Ursache der Lähmung sein könnte, notwendig, Magnesium an verschiedenen Organsystemen vergleichend zu prüfen.

Wir schlossen dabei mit unseren Fragen auch an Untersuchungen von Schneider sowie Schneider und Stötter über periphere Curarin- und Novocainwirkungen und von Richter über Synapsenwirkungen des Nicotins am Skeletmuskel und glatten Muskel des Darmes an.

Es können hier nur einige wichtige Befunde bekanntgegeben werden. Methodische Angaben, Einzelergebnisse und Literaturverarbeitung finden sich ausführlicher in der Dissertation von Hof.

I. Versuche am isolierten Froschmuskel.

Als Modell für die Wirkung des Magnesiums auf die Skeletmuskulatur verwendeten wir den isolierten M. rectus abdominis und den M. sartorius des Frosches (Ranae Esculentae). Dabei prüften wir besonders den Antagonismus zwischen Magnesium und Curarin zu den Überträgerstoffen (Acetylcholin und Kalium).

* Herrn Prof. Dr. R. Schoen, Göttingen, zum 60. Geburtstag gewidmet.

Magnesium wurde verwendet als $MgCl_2 + 6\,H_2O$ (die Konzentration wurde durch Chlorbestimmung überprüft) und als $MgSO_4 + 7\,H_2O$. Die Ergebnisse mit $MgSO_4$ stimmen mit denen des $MgCl_2$ im allgemeinen überein und werden in dieser zusammenfassenden Darstellung nicht aufgeführt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf $MgCl_2$. Acetylcholin wurde als Chlorid der Firma Hoffmann-La Roche[1] aus Trockenampullen, Kaliumchlorid als Präparat pro analysi Merck und Curarin als d-Tubocurarin HAF[1] verwendet.

Die Registrierung der Muskelcontractur erfolgte isotonisch durch Schreibhebel an einem Rußkymographion bei einer Hebelbelastung von etwa 5 g. Magnesium und Curarin wurden der Suspensionsflüssigkeit entweder bei bereits bestehender Muskelcontractur durch Acetylcholin oder Kaliumchlorid zugesetzt („Magnesium nachgegeben") oder aber dem ruhenden Muskel zugesetzt, worauf nach 5 min Wartezeit der Zusatz der contracturerregenden Substanz erfolgte („Magnesium vorgegeben"). Die Aufhebung bzw. die Verhinderung der Muskelcontractur wurde in Prozent der Höhe der unbeeinflußten Zuckung angegeben.

Die Ergebnisse der Versuche des Magnesium-Curarin-Antagonismus zu Acetylcholin und Kaliumchlorid haben wir in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1.

Lähmender Stoff	Bedingung	Antagonistisch wirksame Konzentration	
		zu Acetylcholin	zu Kaliumchlorid
Magnesium	vorgegeben	1×10^{-2}	4×10^{-4}
	nachgegeben	2×10^{-2}	4×10^{-3}
Curarin	vorgegeben	2×10^{-6}	—
	nachgegeben	2×10^{-6}	neg. (geprüft bis $1{,}5 \times 10^{-5}$)

Eine Eigenwirkung des Magnesiums auf den Tonus der ruhenden Muskulatur haben wir in den von uns geprüften Konzentrationen nicht festgestellt.

Aus den aufgeführten Versuchen ist ersichtlich, daß Magnesium deutlich antagonistisch zu Kaliumchlorid wirkt, aber erst in etwa 10fach höherer Dosierung gegen Acetylcholin. Dieser Befund ist schwer deutbar, wenn man die Ansicht vertritt, daß Kalium erst durch Acetylcholin freigesetzt wird und Kalium der eigentliche die Muskelcontractur auslösende Stoff ist (Riesser). Dann müßte ein Stoff, der die Kaliumwirkung beeinflußt, auch gegen Acetylcholin gleichermaßen wirksam sein. Aus unseren Versuchen ließe sich also ablesen, daß Kalium nicht der einzige, die Muskelcontractur auslösende Stoff sein kann oder daß Acetylcholin auch über einen anderen Mechanismus als den der Kaliumfreisetzung wirksam werden könnte.

[1] Für die liebenswürdige Überlassung dieser Versuchssubstanzen danken wir den Herstellerfirmen.

Unsere Befunde ließen sich vielleicht aber auch so deuten, daß Magnesium die durch Acetylcholin ausgelöste Contractur nicht verhindert, da es selbst in die Zelle nicht eindringen und damit die intracellulär stattfindende Kaliumfreisetzung nicht beeinflussen kann. Die Kalium-Contractur kann Magnesium dagegen durch Ionenantagonismus aufheben, weil Kalium in diesem Fall von außen an die Zelle herantritt, wo es von Magnesium erreicht werden kann. Zur Aufhebung einer bereits bestehenden Contractur sind deshalb auch etwa 10fach höhere Dosen von Magnesium erforderlich als zur Verhütung einer folgenden Contractur.

Neben der chemischen Reizung durch erregungsauslösende Stoffe verwendeten wir auch noch die elektrische Reizung des Muskels. Dabei wurden nach der Methode von E. Frey beide Musculi sartorii einer Rana Esculenta gleichzeitig hintereinander in den sekundären Stromkreis eines Schlitteninduktoriums geschaltet, dessen Schließungszuckung ausgeblendet werden konnte. Die Einrichtung gestattete, verschiedene Frequenzen (0,5, 8 und 25 Hz) zu benutzen. Es wurden Reizserien von 20 Einzelreizen bei 0,5 Hz, 20 sec Reizdauer bei 8 Hz und 10 sec bei 25 Hz gesetzt. Der eine Musculus sartorius lief als Kontrolle in Ringer-Lösung mit, während auf den anderen die zu prüfende Substanz vorher 5 oder 10 min einwirkte. Beide isotonisch durch Schreibhebel auf ein Rußkymographion aufgezeichneten Contractionskurven wurden miteinander verglichen. Der Leistungsabfall des einen Muskels wurde berechnet gegenüber dem der Kontrolle.

Wie bei jeder direkten Reizung am frischpräparierten ganzen Muskel läßt sich auch bei unserem Vorgehen nicht festlegen, daß wir nur die Muskelfaser selbst gereizt haben. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß die noch funktionstüchtigen intramuskulären Nerven wegen ihrer niedrigeren elektrischen Schwelle mitgereizt wurden. So entspricht der gefundene Schwellenwert für Curarin (2×10^{-6}) etwa dem bei Froschdurchströmung gefundenen Wert von $1{,}3 \times 10^{-6}$ für die indirekte Muskelreizung (Schneider und Stötter). Für eine „indirekte Reizung" spricht auch die Beobachtung, daß mit unserer Methode die Hubhöhe der Muskelcontraction nach vorangehendem Tetanus größer war, als dies Riesser für ermüdete, indirekt gereizte Muskeln beschrieb. Ferner spricht für eine indirekte Reizung bei unserer Methode die Verminderung der Hubhöhe durch das nur an der Nervenendplatte angreifende Curarin.

Die für die einzelnen Stoffe zu einer 20—30% igen Leistungsverminderung benötigten Dosen bei elektrischer Reizung des Musculus sartorius sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2. *Grenzkonzentrationen für eine 25%ige Verminderung der Hubhöhe am elektrisch gereizten Musculus sartorius des Frosches.*

Reizfrequenz	Magnesium	Curarin	Novocain
0,5 Hz . . .	1×10^{-3}	7×10^{-7}	1×10^{-5}
8 Hz . . .	1×10^{-3}	2×10^{-6}	
25 Hz . . .	1×10^{-3}	5×10^{-6}	2×10^{-5}

Magnesium und Curarin ergaben ein unterschiedliches Verhalten im Hinblick auf die Wirksamkeit verschiedener Frequenzen: Magnesium setzte bei allen geprüften Reizfrequenzen die Muskelleistung in etwa der gleichen Konzentration herab, die der für den Antagonismus zu Kalium am Froschrectus (siehe S. 177) entspricht. Dagegen war für Curarin in höheren Frequenzen eine größere Konzentration erforderlich, um den gleichen Effekt zu erzielen. Novocain wies nur eine angedeutete Frequenzabhängigkeit auf, wobei die Dosierung erheblich unter der zur Lokalanästhesie benötigten liegt. Es liegt daher für das Curarin die Deutung nahe, daß bei der durch höhere Frequenzen stärkeren Acetylcholin-Freisetzung eine größere Curarinmenge notwendig ist.

Für Magnesium ist bei verschiedenen Frequenzen die Wirkung vielleicht deshalb gleich, weil es möglicherweise an der Endplatte muskulär angreift und dort nicht als Acetylcholin-, sondern als Kalium-Antagonist wirkt. Voraussetzung dafür ist freilich, daß bei der Muskelcontraction stets die gleiche Kaliummenge in der Zelle freigesetzt wird.

Unsere Ergebnisse stehen in einem gewissen Gegensatz zu denen von Bülbring, die für Curarin am Nerv-Muskel-Präparat des Rattenzwerchfelles, allerdings bei reiner indirekter Reizung und allgemein noch niedrigeren Frequenzen (0,005—0,3 Hz) bei ihren höheren Reizfrequenzen eine stärkere Lähmung beobachtete. Bei ihren Versuchen dürfte sich die Curarinwirkung mit den Ermüdungsvorgängen an den Synapsen addiert haben. Erstaunlich bleibt jedoch, daß Magnesium, dem man wie Curarin nach Stanbury auch eine synaptische Wirkung zuschreibt, nicht das gleiche Verhalten wie Curarin, sondern eher wie ein muskellähmender Stoff zeigt.

Die erwartete Frequenzabhängigkeit ist von uns auch tatsächlich am intakten Ganzfrosch bei indirekter Reizung, allerdings nur in einem bestimmten Lähmungsstadium bei Reizung des motorischen Nerven gefunden worden (siehe S. 181). Auch Engbaek machte unter anderen Wirkungsbedingungen die gleiche Beobachtung. Der Widerspruch zu unseren Befunden am isolierten Muskel kann also noch nicht ganz geklärt werden.

Ein Vergleich der bei elektrischer Reizung gefundenen Werte mit den zu Acetylcholin antagonistischen Konzentrationen gibt einen weiteren Anhalt für den verschiedenen Angriffspunkt für Magnesium und Curarin: Bei Magnesium ist die gegen Acetylcholin antagonistisch wirkende Konzentration 10mal stärker als die zur Senkung der Kontraktionshöhe des elektrisch gereizten Muskels erforderliche Dosis (10^{-2} gegenüber 10^{-3}). Bei Curarin sind sowohl zum Acetylcholin-Antagonismus als auch bei elektrischer Muskelreizung gleichermaßen 2×10^{-6} wirksam. Da Acetylcholin nach Riesser an der Stelle Nerv-Nervenendplatte angreift, ist die contractionssenkende Eigenschaft des Curarins ebenfalls dort zu

lokalisieren, während auch nach unseren Ergebnissen Magnesium zwar dort ebenfalls wirksam ist, aber bereits in geringeren Konzentrationen auf eine andere Weise die Contraction hemmt.

Um auch Säugetiermuskeln in situ in unsere Versuche einzubeziehen, bedienten wir uns der elektrischen Reizung der Kaumuskulatur der Ratte nach Hotovy. Dabei werden ebenfalls die intramuskulären Nerven mitgereizt, wie das auch bei unseren geprüften Froschmuskeln der Fall war. Magnesium zeigte bei 0,25 g/kg (intraperitoneal gegeben) einen Leistungsabfall von 20%. Bei Annahme gleichmäßiger Verteilung in der gesamten Körpersubstanz würde $MgCl_2$ am Hotovy-Präparat in einer Konzentration von rund 3×10^{-4} wirken. Da die Konzentration von Magnesium durch nicht vollkommene Verteilung aber zweifellos höher ist, kommt man durchaus in Größenordnungen von 10^{-3}, die auch Leistungsabfall am elektrisch gereizten isolierten Froschmuskel zeigten.

II. Erregbarkeitsverhältnisse unter Magnesium.

Versuche am ganzen Frosch:

Bei völliger Lähmung des Tieres durch Magnesium ist auch die Nerv-Muskelübertragung ausgeschaltet. In keinem Lähmungsstadium wurde der sogenannte „Vulpian-Effekt", wie etwa bei Curarin, beobachtet.

Dieser besteht darin, daß der Muskel vom Nerven aus noch elektrisch erregbar ist, während die Willkür- und Reflexbeweglichkeit bereits vollkommen aufgehoben sind (vgl. Schneider und Stötter).

Nach Dosen von Magnesium, die den Frosch nicht völlig lähmten, trat eine Frequenzdivergenz bei indirekter Reizung vom Nervus Ischiadicus auf: Die Schwelle für motorisch elektrische Reizung war bei niedrigen Frequenzen (2—5 Hz) stark heraufgesetzt, während sie für höhere Frequenzen 20—50 Hz) noch normal blieb. Dadurch erscheinen die *Reizzeitspannungskurven für verschiedene Frequenzen* stark auseinandergezogen, ein Befund, der bei Curarin nicht beobachtet wurde. Als Beispiel ist ein Versuch in Abb. 1 aufgeführt, in der wir die motorischen Reizzeit-Stromstärkenkurven bei verschiedenen Frequenzen nach Magnesium darstellten. Demgegenüber bestehen am normalen Tier keine Abweichungen in verschiedenen Frequenzbereichen.

In Versuchen mit dem Froschpräparat nach Claude Bernard und Kölliker bewirkte $MgCl_2$ (5 g/kg) nach 60—90 min Lähmung des normal durchbluteten Beines, während am abgebundenen Bein Reflexe von allen möglichen Hautpartien auslösbar waren. Da sich unter Magnesium die Muskelschwelle kaum veränderte, kann man nach diesen Versuchen auf einen *curareähnlichen Angriffspunkt für Magnesium* schließen, nämlich peripher an der Übergangsstelle vom Nerv zum Muskel. Ein Unterschied zur Curarinwirkung ergibt sich aber aus dem bei Magnesium fehlenden Vulpian-Effekt.

Vergleichende Versuche mit *Nicotin* am Claude Bernard-Präparat ergaben entgegen der Ansicht, daß Nicotin allein die Synapsen blockiert, nur zunächst ein curareähnliches Verhalten: Bei völliger Lähmung des nichtabgebundenen Beines schließlich auch für elektrischen Strom war vom Nerven des vom Blutstrom isolierten Beines der Muskel voll erregbar; es waren auch Reflexe von allen Hautpartien auslösbar. Erst nach 60—90 min war die Reflexerregbarkeit bei vorläufig noch erhaltener elektrischer Reizbarkeit des motorischen Nerven aufgehoben, d. h. die Rückenmarkssynapsen waren gelähmt. Am intakten Ganzfrosch zeigte

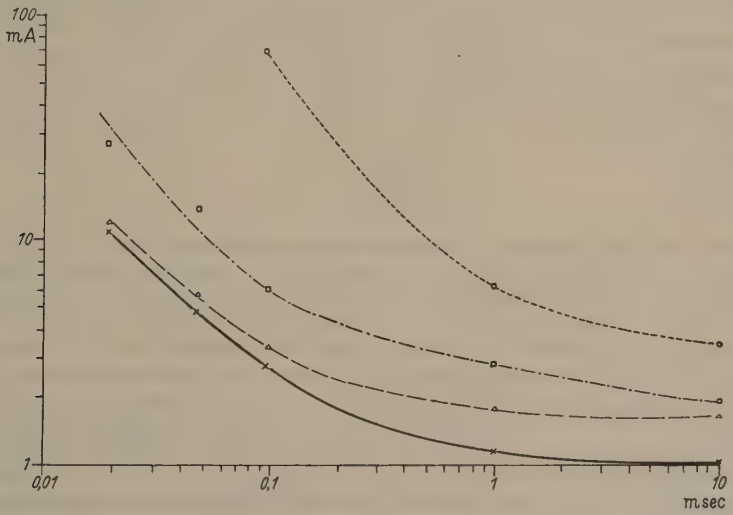


Abb. 1. Reizzeitstromstärkekurven für die Schwellenzuckung eines Mg-vergifteten Frosches bei verschiedenen Reizfrequenzen (Prot. Nr. 9). Frosch erhielt 6 Std vorher $MgCl_2$ 3,0 g/kg in den Lymphsack. Atmung, Spontanbewegungen und Reflexe erhalten. Decapitation, Freilegung des Nervus ischiadicus, dort Reizung mit Silberelektroden. Beobachtung der Minimalzuckung der Froschpfote.
×———× 50 Hz, Δ———Δ 20 Hz, □———□ 10 Hz, ⊙———⊙ 0,5 Hz.

sich nach Eintritt der Lähmung auch deutlich der bei Curarin erwähnte Vulpian-Effekt.

III. Versuche am Darmpräparat nach Magnus.

Die lähmende Wirkung des Magnesiums auf glattmuskelige, autonom innervierte Organe wurde am Beispiel des isolierten Kaninchen- und Meerschweinchendarmes geprüft. Es wurden die erforderlichen Grenzkonzentrationen bestimmt für die Hemmung der Automatie, die Senkung des Tonus und für die antagonistische Wirkung gegenüber verschiedenen darmerregenden Stoffen bei Vorausbehandlung mit Magnesium. Tab. 3 stellt diese Ergebnisse kurz zusammen.

Aus den aufgeführten Werten ist ersichtlich, daß Magnesium keine spezifisch nicotinolytische Wirkung hat. Ebenso ist die notwendige Magnesium-Konzentration für den Antagonismus zum vagotropen Doryl zu groß, um auf einen parasympathicolytischen Effekt schließen zu können. Daß die $BaCl_2$-Contractur in etwas niedrigerer Dosierung von Magnesium aufgehoben wird, kann auf einem Ionenantagonismus von Magnesium gegen Barium beruhen, oder aber in einem muskulärspasmolytischen Effekt des Magnesiums begründet sein. Da nun für Barium z. B. bei Herzflimmern eine „Synapsenwirkung" diskutiert wird, ist ein Angriffspunkt des Magnesiums ebenfalls an den Synapsen des vegetativen Nervensystems am Darmmuskel nicht ausgeschlossen. Für eine direkt muskuläre Wirkung des Magnesiums spricht dagegen

Tabelle 3. *Wirksame Magnesiumchlorid-Konzentrationen am Kaninchendarm* (Werte für den Meerschweinchendarm in Klammern).

	Vollständige Hemmung	Partielle Hemmung
Automatie	6×10^{-4} (6×10^{-4})	2×10^{-4} (2×10^{-5})
Tonus	2×10^{-4} (—)	2×10^{-5} (6×10^{-6})
gegen $BaCl_2$. . . .	6×10^{-4} (6×10^{-4})	2×10^{-4} (2×10^{-5})
gegen Doryl . . .	2×10^{-3} (1×10^{-3})	2×10^{-4} (2×10^{-5})
gegen Nikotin . .	2×10^{-3} (1×10^{-3})	1×10^{-3} (6×10^{-4})

die schon mit geringer Dosis erfolgende Darmtonussenkung gegenüber der deutlich schwächeren Wirkung auf die Automatie, wie dies auch für andere muskulär spasmolytisch wirksame Pharmaka festgestellt worden ist (Hoffmann und Kempe).

Auch bei Zugrundelegung der Ergebnisse von Feldberg und Lin kann für Magnesium ein Angriffspunkt an der glatten Muskulatur selbst angenommen werden. Die Längsmuskulatur, die für den Darmtonus bedeutungsvoll ist, wird nicht von Nerven versorgt, daher von Curarin auch nicht beeinflußt. Nur die nervös reichlich ausgestattete Ringmuskulatur wird von Curarin gelähmt. Dieser Stoff wirkt am Darm deutlich antagonistisch zu Nicotin. Magnesium dagegen senkt stark den Darmtonus (2×10^{-4}), hemmt dagegen Nicotin erst in erheblich höherer Konzentration (2×10^{-3}). Danach ist bei Magnesium an der glatten Muskulatur die direkte Muskelwirkung wesentlich eher zu erzielen als die Beeinflussung vegetativer Synapsen.

IV. Wirkung des Magnesiums auf das Zentralnervensystem.

Als Test für zentrale Wirkungen wurde von uns der galvanische Hautreflex als ein zentraler Vorgang mit mehreren Schaltstellen im Rückenmark (Goadby und Goadby sowie Schneider) und die Elektrokrampfschwelle (Gerlich) geprüft.

Der *galvanische Hautreflex* an Fröschen wurde von Magnesium in folgender Weise beeinflußt: Im Lähmungsstadium wird der galvanische Hautreflex abgeschwächt. Daraus ist einmal ein zentraler Angriffspunkt des Magnesiums in Lähmungsdosis abzulesen, denn das peripher lähmende Curarin läßt den galvanischen Hautreflex trotz voller Lähmung bestehen. Andererseits würde bei einem nur rein zentralen Angriffspunkt der galvanische Hautreflex bereits in einem viel früheren Stadium abgeschwächt bzw. aufgehoben werden, wie dies z. B. bei den Narkotica der Fall ist, die schon vor Eintritt einer vollen Lähmung den Reflex ver-

hindern. Da dies aber bei Magnesium nicht der Fall ist, kann es nicht allein zentral wirksam sein.

Das dazu vergleichsweise geprüfte Nicotin zeigte bei dieser Versuchsanordnung am intakten Frosch einen deutlich zentralen Angriffspunkt, indem der galvanische Hautreflex schon abgeschwächt bzw. aufgehoben wurde, als noch keine motorische Lähmung zu erkennen war. Diese Schlußfolgerungen waren nur möglich durch den Vergleich der Wirkungen von Magnesium und Nicotin am curarisierten und am unvorbehandelten Frosch.

Elektroschockversuche an Ratten (Methode vgl. bei J. Wolf nach Gerlich) ergaben eine Erhöhung der Krampfschwelle erst in Dosen, die bereits lähmend wirkten. Dabei dürfte eine zentrale Hemmung der elektrischen Erregbarkeit durch Magnesium wahrscheinlich sein; denn bei nur peripherer Lähmung würde sich nur das Krampfbild ändern, nicht aber eine Erhöhung der Schwelle einstellen.

Zusammenfassung.

Die Frage des peripheren oder zentralen Angriffes der Magnesiumlähmung wurde erneut unter besonderer Berücksichtigung synaptischer Angriffspunkte geprüft.

Am Rectuspräparat des Frosches zeigte Magnesium eine antagonistische Wirkung gegenüber der Kaliumkontraktur, dem Acetylcholin gegenüber aber erst in 10fach höherer Konzentration. Curarin hemmte nur Acetylcholin.

Bei elektrischer Reizung des M. sartorius mit verschiedenen Frequenzen ergaben sich Unterschiede in der Hemmung durch Magnesium, Curarin und Novocain.

Auch die Prüfung der Erregbarkeitsverhältnisse am Nerv-Muskel-System unter Magnesiumlähmung ergab gewisse Abweichungen der Reizzeit-Stromstärkekurven gegenüber den Curarinversuchen.

Am isolierten Darmstreifen besitzt Magnesium einen muskulären Angriffspunkt. Auch eine Synapsenlähmung im vegetativen Nervensystem erscheint möglich.

Zentralnervös lähmende Eigenschaften des Magnesiums konnten erneut nachgewiesen werden aus dem Verhalten des galvanischen Hautreflexes und der verminderten Erregbarkeit bei der Elektroschockprüfung.

Literatur.

Bernard, Cl.: C. r. Acad. Sci. Paris **43**, 825 (1856). — Bülbring, E.: J. of Pharmacol. **1**, 38 (1946). — Engbaek, L.: Pharm. et tox. acta (Scand.) **4**. Sppl. 1. — Feldberg, W., u. R. C. Y. Lin: J. of Pharmacol. **4**, 33 (1949). — Frey, E.: Methode beschrieben bei O. Schünemann, Dissertation Göttingen 1941; H. Hardt, Dissertation Göttingen 1951. — Gerlich, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 159

(1949). — Goadby, K. W., and H. K. Goadby: J. of Physiol. (brit.) **109**, 177 (1949). — Hof, Cl. von: Dissertation Göttingen 1951. — Hoffmann, G., u. D. Kempe: Klin. Wschr. **1951**, 349. — Hotovy, R., u. A. Hardt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 264 (1950). — Köllicker, A.: Virchows Arch. **10**, 3 (1856). — Magnus, R.: Einfaches pharmakologisches Praktikum für Mediziner, S. 26, Berlin 1921. — Richter, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 281 (1939). — Riesser, O.: Muskelpharmakologie und ihre Anwendung in der Therapie der Muskelkrankheiten. Bern 1949. — Pflügers Arch. **250**, 173 (1948). — Schneider, H.-H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 168 (1950). — Dtsch. med. Wschr. **1951**, 397. — Schneider, H.-H., u. Stötter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 153 (1950). — Stanbury: J. of Pharmacol. **93**, 52 (1948). — Wolf, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck 1951).

Dr. H.-H. Schneider, Göttingen, Geiststr. 9, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 185—192 (1952).

Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens).

Ein Beitrag zur Frage der Organspezifität von Histaminreceptoren.

Von
Gerhard Zetler.

(Eingegangen am 18. August 1951.)

Schon aus theoretischen Gründen kann die Forderung nach organspezifischen Histaminreceptoren erhoben werden: Nach der Adsorptions-Verdrängungstheorie des Histamin-Antihistamin-Mechanismus (siehe Zetler[1]) besitzen die Receptoren, an denen sich diese Antagonismen abspielen, den Charakter einer Oberfläche und bedürfen somit ebenso wie fermentative Prozesse und Narkosephänomene der Mitwirkung der ungestörten Struktur, seien es nun Membranen, Phasengrenzflächen oder Makromoleküle (z. B. der Blutgerinnungskomponenten: Zetler[2,3]). Die pathologischen Erscheinungen, die Histamin hervorrufen kann, sind ebenso verschieden wie die normalen Funktionen der jeweils betroffenen Organe. Die Unterschiede zwischen den zahlreichen Organen des Organismus erstrecken sich aber nicht nur auf ihre Funktion, sondern auch auf ihren chemischen Aufbau, wie Abderhaldens[4] bekannte Abwehr-Ferment-Methode so klar beweist. Daß nun auch die feinen Strukturen, Grenzflächen und Receptoren organspezifisch sind, ließe sich an Beispielen aus Histologie, Pharmakologie und Toxikologie (auch hinsichtlich der Bakterientoxine) zeigen.

Für Histamin besitzen die HCl-produzierenden Zellen der Magenschleimhaut Receptoren, die von denen aller anderen Organe abweichen, da in diesem Falle die Antihistaminica nicht histaminantagonistisch, sondern eher histaminsynergistisch wirken (Döscherholmen[5]; Moersch, Rivers u. Mevloch[6]; Gilg[7]; Emmelin u. Frost[8]; Doran[9]). Unsere Hypothese (Zetler[1]) geht dahin, daß die Receptoren-Oberflächen der HCl-produzierenden Zellen ebenso wie im Modellversuch Kaolin zwar Histamin, nicht aber Antihistaminica adsorbieren, so daß die Grundbedingungen für den Vorgang der adsorptiven Verdrängung nicht gegeben sind; der in diesem Falle synergistische Effekt der Antihistaminica erweist sich bei konsequenter Anwendung der Hypothese der adsorptiven Verdrängung des Histamins durch Antihistaminica als nur scheinbares Paradoxon (Zetler[1]). Die Receptoren in der Magenschleimhaut sind gegen alle Antihistaminica unempfindlich, eine Adsorption der Antihistaminica und damit ein typischer Antihistamineffekt auf die HCl-Produktion des Magens nach parenteraler Histamingabe oder Vagusreizung konnte jedoch durch eine Beeinflussung der Receptoren durch das intravenös verabreichte Netzmittel „TWEEN 20" herbeigeführt werden (Linde[10]).

Von besonderem Interesse ist ein Histamin-Analogon, das Lee u. Jones[20] synthetisierten („Compound XXIV"), und das sich von Histamin durch den Einbau des Pyrazol-Rings an Stelle des Imidazol-Rings unterscheidet (also 3-[β-

Äthylamin]-pyrazol). Rosiere u. Grossman[21] zeigten, daß Compound XXIV nur noch die HCl-Produktion des Magens stimuliert, ohne alle anderen Histaminwirkungen aufzuweisen (Histamin wirkt 700mal stärker blutdrucksenkend als Compound XXIV). Dies ist ein neuer deutlicher Hinweis auf die besonderen Eigenschaften der Histaminreceptoren in der Magenschleimhaut.

Da nun die Adsorption von Histamin und dessen Verdrängung durch Antihistaminica auf ein und derselben Receptoren-Oberfläche stattfinden müssen, könnte man theoretisch auch Receptoren erwarten, die nur gewisse Antihistaminica adsorbieren, d. h. die Organspezifität der Histaminreceptoren müßte sich also nicht nur dem Histamin, sondern auch den Antihistaminkörpern gegenüber äußern. In der Tat zeigte Loew[11], daß niedere Alkyl-Homologe von α-Naphthylmethyl-alkyl-β-chloraethylamin und von β-(2-Biphenyloxy)-aethyl-alkyl-β-chloraethylamin gegen Histaminbronchospasmus und -Blutdrucksenkung wirkten, während die höheren Alkyl-Homologen nur noch gegen den Blutdruckabfall wirksam waren, gegen den Bronchospasmus jedoch versagten. Daraus möchten wir schließen, daß die Receptoren-Oberflächen in der Bronchialmuskulatur von denen der Gefäßmuskulatur verschieden sind.

Wir werden Befunde schildern, wonach die Histaminreceptoren im Bereiche der Wärmeregulation sich grundlegend von denen der Bronchialmuskulatur unterscheiden.

Methodik.

Männliche erwachsene Meerschweinchen wurden in einem gleichmäßig temperierten Raum (22° C) gehalten, in dem auch die Versuche unternommen wurden. Histamin- und Antihistaminlösungen wurden subcutan injiziert, alle 10 min die Körpertemperatur rectal mit Maximumthermometern genau 2 h lang gemessen sowie das Auftreten und Verschwinden des Bronchospasmus notiert. Die Temperaturschwankungen wurden in Millimeterpapier eingetragen (Abscisse: 1 cm = 10 min, Ordinate: 1 cm = 0,1° Temperaturänderung) und die von den entstehenden Kurven überdeckten Flächen (Planimetrie) verwertet („Schockgröße" in cm²). Die Ergebnisse werteten wir statistisch nach der t-Methode von Student (Hosemann[12]; Weber[13]) aus. Einzelheiten der Methodik und die Ergebnisse dieser Versuche schilderte speziell im Hinblick auf die Schwankungen der Körpertemperatur L. Schlosser (Dissertation Kiel 1951).

Ergebnisse.

Unsere Versuche bestätigten, daß im Histaminschock die Körpertemperatur sinkt (Dale und Laidlaw[14]), ferner daß auch die Antihistaminica die Körpertemperatur senken (Halpern und Briot[15]). Es ergab sich, daß Antistin*, Pyribenzamin*, Synopen*, Thephorin* und Neo-Antergan* in der Dosierung 2,7 mg/kg subcutan allein verabreicht keine Temperatursenkung mehr hervorrufen, jedoch die Wirkung von 2,0 mg/kg

* Warenzeichen für Antihistaminkörper. Für die freundliche Überlassung der von uns untersuchten Antihistaminica danken wir folgenden herstellenden Firmen: CIBA (Antistin, Pyribenzamin), SPECIA (Neo-Antergan), GEIGY (Synopen) und HOFFMANN-LA ROCHE (Thephorin).

Histamin subcutan auf die Körpertemperatur signifikant vermindern (Antihistaminica 20 min vor Histamin verabreicht). Histamin allein erzeugte eine Schockgröße von 178,8 cm^2, nach Vorbehandlung mit Antistin 119,4 cm^2, mit Pyribenzamin 82,3 cm^2, mit Synopen 78,7 cm^2, mit Thephorin 56,6 cm^2, mit Neo-Antergan 16,1 cm^2; sogar eine Antistin-Dosis (30 mg/kg), die selbst die Körpertemperatur senkte (27,1 cm^2), reduzierte die Histaminwirkung (86,5 cm^2) — alle angeführten Zahlen sind Mittelwerte aus mindestens 10 Versuchen —.

Ferner zeigte sich, daß es richtiger ist (geringere Fehlerbreite), temperatursenkende Histamingaben nach dem Körpergewicht und nicht nach der Körperoberfläche zu dosieren. Dies erklären wir so: Kleine Tiere kühlen wegen ihrer relativ größeren Körperoberfläche schneller ab als große Tiere; sollen nun die großen Tiere mit den kleinen hinsichtlich der Abkühlung Schritt halten, so muß der temperatursenkende Stoff bei den größeren Tieren relativ überdosiert werden, was bei der Berechnung der Dosen nach dem Körpergewicht geschieht.

Tabelle 1. *Schockgröße und Bronchialkrampf nach 2,0 mg/kg Histamin subcutan.*

Tier Nr.	Schockgröße in cm^2	Schockmaximum nach min	Bronchospasmus	Beginn des Bronchospasmus nach min	Dauer des Bronchospasmus in min
1	243,2	90	+	5	45
2	273,3	90	+	4	50
3	157,5	80	+	5	40
4	176,8	50	+	6	45
5	152,7	100	+	5	35
6	105,8	70	+	5	60
7	89,7	70	+	4	55
8	149,4	90	+	4	50
9	197,8	70	+	7	40
10	306,2	70	+	5	45
11	194,7	60	+	5	40
12	115,2	70	+	6	45
13	264,6	70	+	7	45
14	272,9	70	+	4	50
15	257,6	60	+	5	45
16	139,5	50	+	5	40
17	93,5	60	+	5	40
18	187,8	60	+	6	50
19	164,4	70	+	4	45
20	176,6	70	+	7	45
21	108,3	40	+	4	30
22	153,3	40	+	5	35
23	158,7	80	+	6	60
24	220,4	50	+	4	35
25	102,5	40	+	4	30
Mittel:	178,8	66,8		5	44
$\pm \varepsilon_x$:	12,54	3,24		0,2	1,58

ε_x = Mittlerer Fehler des Mittelwertes!

Ein besonderes Augenmerk richteten wir auf das Verhalten des Bronchospasmus, um festzustellen, wie der Bronchialkrampf, der nach den von uns angewandten Histamindosen regelmäßig auftrat, sich in das gesamte Schockgeschehen (Abfall der Körpertemperatur) einordnet. Bei allen von uns angewandten Histamindosen trat Bronchospasmus auf, als typisches Beispiel mögen die Verhältnisse nach 2,0 mg/kg Histamin dienen (Tabelle 1). Regelmäßig trat der Bronchialkrampf wenige Minuten nach der Histamingabe ein und war immer bereits *vor* dem Maximum der Temperatursenkung wieder verschwunden. Nach 2,0 mg/kg Histamin lag das Schockmaximum 67 min nach der Histamingabe, der Bronchospasmus war bereits nach 44 min abgeklungen (die Differenz zwischen

Tabelle 2. *Schockgröße und Bronchialkrampf nach 2,0 mg/kg Histamin, 20 min vorher 2,7 mg/kg Antistin.*

Tier Nr.	Schockgröße in cm^2	Schockmaximum nach min	Bronchospasmus	Beginn des Bronchospasmus nach min	Dauer des Bronchospasmus in min
1	58,2	60	+	40	10
2	113,2	70	+	20	30
3	140,0	100	+	40	40
4	110,3	50	+	20	40
5	196,5	50	+	20	40
6	139,5	60	⌀	—	—
7	144,5	50	+	30	20
8	52,1	50	+	35	10
9	93,2	60	+	30	30
10	146,5	50	+	20	40
Mittel:	119,4	60		28,3	28,8
$\pm \varepsilon_x$:	13,83	5,96		2,58	3,78

beiden Werten ist signifikant für eine Sicherheitsgrenze von 0,27%). Das Maximum des Bronchospasmus wird man natürlich noch früher als insgesamt 49 min nach der Histamininjektion ansetzen müssen. Alle Antihistaminica (2,7 mg/kg) außer Antistin unterdrückten den Bronchialkrampf nach 2,0 mg/kg Histamin, so daß auch in dieser Hinsicht im Rahmen unserer Versuche Antistin am schwächsten wirkte. Es ergab sich jedoch der auffallende Befund (Tabelle 2), daß durch die Antihistamin-Vorbehandlung der Zeitpunkt des Schockmaximums sich nicht änderte (fehlende Signifikanz), der Bronchialkrampf jedoch 5—6 mal später einsetzte und wesentlich kürzere Zeit andauerte (volle Signifikanz).

Durch diese Befunde deutet sich schon an, daß die Receptoren in der Bronchialmuskulatur sich anders verhalten als diejenigen, durch deren Besetzung Histamin die Körpertemperatur vermindert. Besonders unterstrichen wird diese Ansicht jedoch durch Versuche in Veronal*-Halb-

* Veronal-Na: Warenzeichen für Natrium diäthylbarbituricum.

narkose nach Bruns u. Hahn[16], die in Tabelle 3 zusammengefaßt sind. Die Temperaturstürze nach Histamin (2,0 mg/kg) und Antistin (30,0 mg/kg) nahmen durch die Veronal-Vorbehandlung zwar zu (Histamin von 178,8 cm^2 auf 205,6 cm^2; Antistin von 27,1 cm^2 auf 47,2 cm^2), änderten sich jedoch nicht signifikant, womit wir die Histamin-Temperatur-Versuche von Gyermek[17] an Ratten in tiefer Luminal- und Morphin-Scopolamin-Narkose bestätigen. Daraus schließen wir auf Grund der Vorstellungen von Bruns u. Hahn[16], daß beide Stoffe (Histamin und Antistin) am gleichen Substrat, vielleicht am Wärmezentrum, angreifen (eine gefäßerweiternde Wirkung von Histamin, die zu vermehrter Wärmeabgabe seitens der Haut führen könnte, ist beim Meerschweinchen nie

Tabelle 3. *Schockgröße und Bronchialkrampf nach 2,0 mg/kg Histamin, 20 min vorher 60 mg/kg Veronal-Natrium-subcutan.*

Tier Nr.	Schockgröße in cm^2	Schock-maximum nach min	Broncho-spasmus	Beginn des Broncho-spasmus nach min	Dauer des Broncho-spasmus in min
1	143,4	100	∅	—	—
2	209,3	80	∅	—	—
3	233,4	90	∅	—	—
4	258,8	80	∅	—	—
5	279,8	70	∅	—	—
6	187,4	100	+	30	10
7	205,1	100	∅	—	—
8	165,2	110	+	30	20
9	210,6	100	∅	—	—
10	162,8	80	∅	—	—
Mittel:	205,6	91	—	—	—
$\pm \varepsilon_{\bar{x}}$:	13,66	4,07	—	—	—

beobachtet worden). Tabelle 3 zeigt nun, daß nach Veronal trotz stärkeren Schocks mit signifikant verlängerter Dauer des Schockanstiegs ein Bronchospasmus nur noch bei zwei Tieren auftrat. Wie nach Antistin erschien in diesen beiden Fällen der Bronchialkrampf verspätet und dauerte kürzere Zeit.

Diskussion.

Aus den geschilderten Befunden geht hervor: Histamin besetzt und verläßt die Receptoren in der Bronchialmuskulatur bedeutend schneller als die Receptoren, über die es die Körpertemperatur beeinflußt. Daß Antihistaminbehandlung die Dauer des Bronchialkrampfes beeinflußt, nimmt nicht wunder; warum jedoch nach Antistin der Beginn des Bronchospasmus so erheblich verzögert ist, ist schwer zu deuten. Möglicherweise besetzt das Antihistaminicum die Receptoren in den Muskelfasern, die vom Säftestrom als erste erreicht werden. Das 20 min später verabreichte Histamin trifft dann zunächst auf die bereits „blockierten“

Muskelfasern und löst erst an „entfernter" liegenden Fasern Kontraktionen und damit den verspäteten Krampf aus. Da die Antihistaminica die Permeabilität der ungeschädigten Zellmembranen vermindern (Derouaux und Lecomte[22]), könnte auch auf diese Weise der Herantritt des Histamins an die Receptoren verzögert werden. Interessanterweise wirkte Antistin auf den Eintritt des Schockmaximums nicht verzögernd, obwohl natürlich auch in diesem Bereiche mit einer Verminderung der Permeabilität der Membranen durch das Antihistaminicum zu rechnen ist. Auch hierin zeigt sich also ein Unterschied zwischen den beiden Histamin-Receptorengruppen. Daß Veronal den Spasmus der Bronchialmuskulatur unterdrückt, ist nicht erstaunlich, da Farmer[18] die Histaminkontraktur des isolierten Meerschweinchendarmes durch Sulfonal, Trional, Chloreton, Paraldehyd, Morphin und 16 weitere Narkotica der Urethan- und Barbitursäurereihe unterdrücken konnte. Im Lichte der Theorie von der adsorptiven Verdrängung des oberflächeninaktiven Histamins durch die oberflächenaktiven Antihistaminica (siehe Zetler[1]) ist die Wirkung der oberflächenaktiven Narkotica ohne weiteres verständlich.

Wäre die Senkung der Körpertemperatur durch Histamin gleichfalls durch eine Erregung, etwa des Kühlzentrums, zustande gekommen, so hätte Veronal den Histamineffekt vermindert. Es war jedoch das Umgekehrte der Fall (Signifikanz ließe sich durch größere Versuchszahl bestimmt erreichen). Trotz der Kontraktion der Hautgefäße des Meerschweinchens nach Histamin könnte eine vermehrte Wärmeabgabe durch die Haut dann erfolgen, wenn gleichzeitig die umlaufende Blutmenge stark vermehrt wird. Aber auch in diesem Falle würde eine starke antagonistische Wirkung der Veronalnarkose zu erwarten sein, da die Versuche mit den Antihistaminica zeigen, daß Hand in Hand mit dem Bronchospasmus auch die Temperatursenkung stark vermindert wird. Hinsichtlich der Histaminwirkung auf die Wärmebildung, Grundumsatz usw. herrscht in der Literatur Unklarheit, eine Abnahme der Wärmebildung nach Histamin scheint jedoch nicht unmöglich. Wenn auch in dieser Hinsicht ein Synergismus von Histamin und Veronal einleuchtet, so bleibt jedoch unverständlich, warum in *diesem* Falle Veronal Histamin *nicht* verdrängt im Gegensatz zu den gleichzeitigen Verhältnissen an der Bronchialmuskulatur.

Es bleibt nur anzunehmen, daß die Receptoren, über die Histamin beim Meerschweinchen die Senkung der Körpertemperatur hervorruft, sich grundlegend biochemisch von denen unterscheiden, über die es den Bronchospasmus hervorruft. Ebenso wie Antihistaminica nicht den Magensaftfluß nach Histamin hemmen, hemmt Veronal nicht die Temperatursenkung nach Histamin, obwohl es *gleichzeitig* den Histaminbronchospasmus unterbindet.

Kaolin adsorbiert Histamin stark, Antihistaminica nicht, so daß an *diesem* Modell im Gegensatz zum Kohlemodell Histamin von Antihistaminen nicht verdrängt wird (Zetler[1]). Wir wagten den Schluß, daß auch die HCl-produzierenden Zellen der Magenschleimhaut Antihistaminica nicht adsorbieren und daß deshalb die Antihistaminica nicht wirken können. Ein Analogon dazu sehen wir darin, daß Veronal offenbar Histamin von den Receptoren im Bereiche der Wärmeregulation nicht, wohl aber von denen der Bronchialmuskulatur verdrängen kann. In reizvoller Weise zeigt ein Vergleich unserer Befunde mit denen von Deutsch, Spitzy u. Wohlrab[19], daß sich die Histamin-Receptoren im Bereiche der Wärmeregulation gegenüber Veronal so verhalten wie die Histamin-Receptoren der Magenschleimhaut gegenüber den Antihistaminica; diese Autoren fanden, daß der Anstieg der Haut- sowie der Abfall der Rectal- und besonders der Magentemperatur nach subcutaner Histamininjektion durch Antistin verhindert wird, daß jedoch die gleichzeitig kontrollierte Magen-HCl-Produktion unverändert in typischer Weise gesteigert bleibt.

Da der Histamin-Bronchospasmus die Basis einer vielbenutzten Routine-Methode zur Wirkungsbestimmung von Antihistaminsubstanzen ist, und da nach Meier und Bein[23] die Frage nach der Ursache der Spezifität pharmakologischer Wirkungen „vielleicht das wesentlichste Problem der Pharmakologie" ist, möchten wir zum Schluß darauf hinweisen, daß gerade der Histaminbronchospasmus sich einem unspezifischen Histaminantagonisten (Veronal) als voll zugänglich erwiesen hat. Da Veronal den Temperaturabfall nicht beeinflußte, Antistin jedoch zugleich mit der Histamintemperatursenkung auch den Bronchospasmus verminderte, aber nicht beseitigte, *wirkte gegen den Histaminbronchospasmus der unspezifische Antagonist paradoxerweise stärker und damit scheinbar „spezifischer" als der spezifische Histaminantagonist.*

Zusammenfassung.

1. Nach subcutaner Injektion von 2,0 mg/kg Histamin beim Meerschweinchen sinkt die Körpertemperatur und es tritt Bronchospasmus auf.

2. Das Maximum des Bronchospasmus tritt viel früher ein als die maximale Senkung der Körpertemperatur, die erst nach völligem Abklingen des Bronchospasmus erscheint.

3. Die Antihistaminica Antistin, Pyribenzamin, Synopen, Thephorin und Neo-Antergan unterdrücken in der Dosierung 2,7 mg/kg (20 min vor Histamin) mit Ausnahme von Antistin den Bronchospasmus völlig und vermindern die Wirkung des Histamins auf die Körpertemperatur verschieden stark. Nach Antistin tritt Bronchospasmus 5—6mal später auf als nach Histamin allein, seine Dauer ist signifikant verkürzt.

4. In Veronal-Halbnarkose (60 mg/kg 20 min vor Histamin) wird der Histaminbronchospasmus unterdrückt, während sich der Histaminschock etwas verstärkt (nicht signifikant).

5. Die Histaminreceptoren in der Bronchialmuskulatur unterscheiden sich demnach grundlegend von denen im Bereiche der Wärmeregulation.

Literatur.

[1] Zetler, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol **213**, 551 (1951). — [2] Zetler, G.: Klin. Wschr. **29**, 255 (1951). — [3] Zetler, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 18 (1951). — [4] Abderhalden, E., u. L. Pincussohn: Hoppe-Seylers Z. **61**, 200 (1909). — [5] Döscherholmen, A.: Acta med. scand. (Stockh.) **135**, 195 (1949). — [6] Moersch, Rivers and Mevloch: Gastroenterology **7**, 91 (1946). — [7] Gilg, E.: Acta pharmacol. **4**, 81 (1948). — [8] Emmelin, N., u. I. Frost: Acta physiol. scand. **13**, 75 (1947). — [9] Doran, F.: Lancet **253**, 490 (1947). — [10] Linde, S.: Experientia (Basel) **5**, 209 (1949). — [11] Loew, E. R.: Ann. New York Acad. Sci. **50**, 1142 (1950). — [12] Hosemann, H.: „Die Grundlagen der statistischen Methoden für Mediziner und Biologen". Stuttgart 1949. — [13] Weber, E.: „Grundriß der biologischen Statistik". Jena 1948. — [14] Dale, H. H., and P. P. Laidlaw: J. of Physiol. **41**, 318 (1910/11). — [15] Halpern, B. N., et M. Briot: Arch. internat. Pharmacodynamie **82**, 247 (1950). — [16] Bruns, F., u. F. Hahn: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **208**, 207 (1949). — [17] Gyermek, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 456 (1950). — [18] Farmer, L.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **39**, 204 (1938). — Ber. Physiol. **113**, 162 (1939). — [19] Deutsch, E., K. H. Spitzy et K. Wohlrab: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 369 (1951). — [20] Lee, H. L., and R. G. Jones: J. of Pharmacol. Exper. Ther. **95**, 71 (1949). — [21] Rosiere, C. E., and M. I. Grossman: Science (Lancaster, Pa.) **113**, 651 (1951). — [22] Derouaux, G., et J. Lecomte: Arch. internat. Pharmacodyn. **87**, 175 (1951). — [23] Meier, R., u. H. J. Bein: Biochim. et Biophys. Acta **4**, 144 (1950).

Dr. med. Gerhard Zetler, Kiel, Pharmakologisches Institut, Hospitalstraße 20

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 193—194 (1952).

Aus der Hautklinik der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Th. Schreus).

Arterenol-Umkehr nach Sympaticolytica am Darm.

Von
Günter Stüttgen.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 18. September 1951.)

Im wesentlichen kommt v. Euler und P. Holtz das Verdienst zu, Pharmakologie und biologische Bedeutung des Arterenols weitgehend aufgeklärt zu haben. Wir prüften aus dermatologischem Interesse die Wirksamkeit des Arterenols und verwandter Stoffe unter verschiedenen Bedingungen an isolierten Organpräparaten; dabei erwies sich das unterste Stück des Meerschweinchenileums als Testobjekt besonders brauchbar (Rummel u. Plester, Munro).

Nach Angaben von Kronenberg und Schümann bewirkt Ergotoxin am Katzenblutdruck bei üblicher Dosierung von Arterenol im Gegensatz zum Adrenalin keine Umkehrwirkung. Erst bei hoher Dosierung von Arterenol konnte West am gleichen Testobjekt eine Umkehrwirkung erzielen. Es liegt uns daran mitzuteilen, daß wir unter besonderen Umständen, nämlich auf Grund einer Veränderung der Ausgangslage des Darmtonus, eine Arterenol-Umkehr nach Gaben von Sympathicolytica wie CCK(Hydergin) und Acetoxy-Thymoxyaethyldimethylamin (Opilon) zeigen konnten.

Methodik.

Im Thermostaten bei 39° C wurde der Meerschweinchendarm (2 cm) in Tyrodelösung unter Luftdurchperlung suspendiert. Die Darmkontraktionen wurden über ein Hebelsystem auf ein Kymographium übertragen. Volumen der Badeflüssigkeit des Darmes 10 ccm.

Das beschriebene Darmstück zeigte auf Oxytyramin, Arterenol, Adrenalin, Acetylcholin wie Histamin eine deutliche Kontraktion. Die genannten Substanzen addieren sich in ihrer Wirkung, während am weiter oberhalb entnommenen Darm Oxytyramin und andere adrenergisch wirkende Stoffe die Kontraktion von Histamin und Acetylcholin hemmen.

Ergebnisse.

Die durch Histamin veränderte Ausgangslage des Darmtonus zeigt auf l-Arterenolgabe eine weitere Kontraktion, während nun nach Zugabe von CCK eine Umkehrwirkung der Sympathine im Sinne einer Darmerschlaffung ersichtlich ist (Abb. 1).

Es ist im Prinzip gleich, ob die zur Demonstration der Sympathin-Umkehrwirkung notwendige Veränderung der Ausgangslage des Darmtonus durch Histamin, Acetylcholin, Oxytyramin oder durch zufällige Spontankontraktion erreicht wird.

Quantitativ unterscheiden sich l-Arterenol und l-Adrenalin nicht wesentlich in ihrer kontraktionserregenden Wirkung wie auch bei der Darstellung der Umkehrwirkung am gleichen Darmstück.

Bei Durchführung der obengenannten Versuche sind die pharmakologischen Nebenwirkungen der verwandten Sympathicolytica zu beachten. Bei unseren Versuchen zeigte das Acetoxy-thymoxyaethyldimethylamin(Opilon) eine zusätzliche Antihistaminwirkung, die die nachfolgenden Acetylcholin- oder Histaminwirkung deutlich hemmte bzw. bei

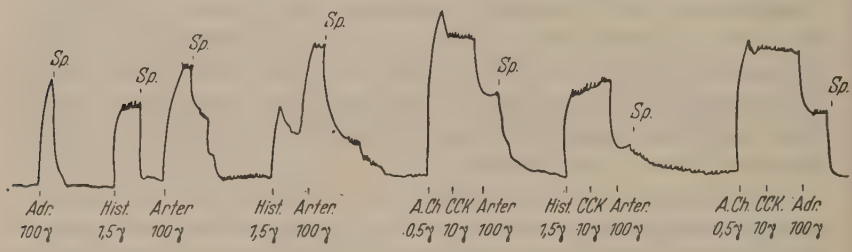


Abb. 1.

vorhergehender Gabe dieser Amine eine Erschlaffung am Darm bewirkte. Bei geeigneter Dosierung, z. B. des Oxytyramins, ließ sich aber auch mit diesem Sympathicolyticum eine Sympathinumkehr erzielen.

Zusammenfassung.

Am Munroschen Ileumstück des Meerschweinchens läßt sich eine Umkehr des l-Adrenalins und der Arterenolwirkung zur Darstellung bringen. Notwendige Voraussetzung dafür ist eine Erhöhung der Ausgangslage des Darmtonus, deren auslösende Ursache hinsichtlich der Sympathinumkehr unspezifischen Charakter hat.

Herrn Dr. Rummel vom Pharmakologischen Institut sei an dieser Stelle für liebenswürdige Beratung bestens gedankt.

Literatur.

Holtz, P., Kronenberg u. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 364 (1950). — Kronenberg, G., u. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 350 (1950). — Munro, A. F.: J. of Physiol. **1951**, S. 84. — Plester, D., et Rummel: Arch. internat. Pharmacodynamie **1951**, S. 431. — West, G. B.: Brit. J. of Pharmacol. **4**, 63 (1949).

Dr. Günter Stüttgen, Hautklinik der Med. Akademie Düsseldorf, Moorenstr. 5.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 195—196 (1952).

Aus der Pharmakologischen Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen (Leiter: Prof. Dr. Dr. W. Koll).

Das Konzentrationsdiagramm als Hilfsmittel zur Bestimmung oder Herstellung einwirkender Endkonzentrationen bei Versuchen in vitro.

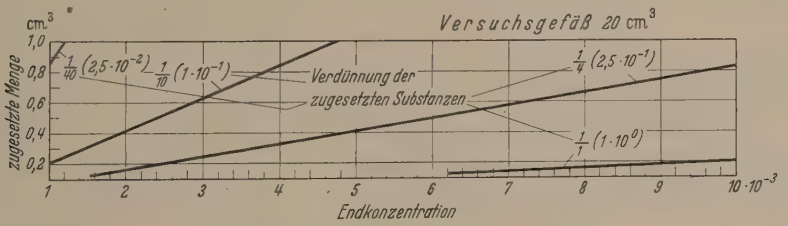
Von

Hans Kaller.

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 18. September 1951.)

Beim Arbeiten mit isolierten Organen kommt man häufig in die Lage, Dosen zu berechnen, die zur Erreichung bestimmter Endkonzentrationen im Versuchsgefäß notwendig sind. Ebenso ist es oft erwünscht, nach Zugabe irgendeiner Dosis die Endkonzentration der wirksamen Substanz zu wissen. Die Berechnung während des laufenden Versuches ist unbequem und mit Fehlermöglichkeiten behaftet.



Das Konzentrationsdiagramm gestattet es, mit einem Blick für jede gewünschte Endkonzentration die notwendige Dosis abzulesen oder auch für jede zugesetzte Dosis die sich daraus ergebende Endkonzentration zu ermitteln. Als einmalige Mühe bleibt das Berechnen und Zeichnen des Diagramms.

Die Abbildung zeigt als Beispiel ein Konzentrationsdiagramm für ein Versuchsgefäß von 20 cm³ Inhalt. Auf der Abscisse stehen die Endkonzentrationen, die Ordinate gibt die Menge der einzupipettierenden Substanz-Verdünnungen in ccm an. Die einzelnen Kurven gelten für die verschiedenen einzupipettierenden Verdünnungen. Aus diesem Diagramm lassen sich Endkonzentrationen *aller* Zehnerpotenzen ablesen: man braucht nur die Endkonzentrationsangabe unter der Abscisse und alle Angaben der Verdünnungen bei den einzelnen Kurven um jeweils gleich viel negative Zehnerpotenzen zu erhöhen.

Beispiel: Gewünscht wird eine Endkonzentration von $8{,}0 \cdot 10^{-5}$. Alle Konzentrationsangaben werden also um 2 negative Zehnerpotenzen erhöht. (Die Kurven tragen dann von unten nach oben die Bezeichnungen 1/100, 1/400, 1/1000 und 1/4000.) Man geht bei 8,0 von der Abscisse aus in das Diagramm ein und trifft auf die Kurve 1/400. Der Schnittpunkt hat den Ordinatenwert 0,66 cm³. Die Endkonzentration von $8{,}0 \cdot 10^{-5}$ wird also erreicht bei Zugabe von 0,66 cm³ der Verdünnung 1/400.

Die Berechnung der einzelnen Kurven des Diagramms geschieht nach der Formel:

$$\text{Endkonzentr.} = \frac{\text{Zugesetzte Menge} \times \text{Verdünnungsgrad der zugesetzten Substanz}}{(\text{Inhalt des Versuchsgefäßes} + \text{zugesetzte Menge})}$$

Man berechnet nach dieser Formel für jede Verdünnung etwa 5 Punkte (z. B. für die Mengen 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 cm³) und zeichnet dann mit Hilfe dieser 5 Punkte die Kurve für die betreffende Verdünnung. Die Kurven verlaufen schwach gekrümmt. Im Hinblick auf die Ablesegenauigkeit nehme man zum Zeichnen einen nicht zu kleinen Bogen Millimeterpapier.

In dem Diagramm ist nur die Verdünnungsreihe 1/1, 1/4, 1/10, 1/40, 1/100 usw. berücksichtigt. Diese Verdünnungsreihe hat den Vorteil, daß man mit ihr in Versuchsgefäßen aller Größen sämtliche Endkonzentrationen herstellen kann, ohne jemals weniger als 0,2 oder mehr als 0,9 cm³ in das Versuchsgefäß einpipettieren zu müssen. (Generelle Verwendung von 1-cm³-Meßpipetten.) Die Beschränkung auf diese einfache Verdünnungsreihe schützt außerdem gegen Verdünnungsfehler.

Das Konzentrationsdiagramm hat sich als einfaches Hilfsmittel bei Versuchen in vitro gut bewährt.

Dr. Hans Kaller, Göttingen, Bunsenstraße 10.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 197—201 (1952).

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Berthold Mueller).

Modifizierte nephelometrische Methode zum Nachweis eines Morphin-Abusus.

Von
P. Seifert und G. Jankowitz.

(Eingegangen am 13. August 1951.)

Die fast 15jährigen Erfahrungen mit der nephelometrischen Methode nach Deckert haben ergeben, daß diese Methode in ihrer Einfachheit allen anderen Morphium-Nachweis-Methoden überlegen ist. Da die Bestimmung mit nur 10 cm^3 Harn auskommt, empfiehlt sie sich als Routinemethode besonders für das klinische Laboratorium. Bei ihrem negativen Ausfall läßt sich mit großer Sicherheit die Gegenwart von Morphium im Organismus verneinen. Der positive Ausfall dagegen muß mit größerer Vorsicht beurteilt werden, da eine ganze Reihe von in pathologischen Harnen vorkommenden Substanzen sowie viele Medikamente, deren Gegenwart nicht immer mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, den Nachweis stören können.

Der Umfang der störenden Substanzen wird zweifellos durch die von Deckert selbst angegebene Modifikation seiner Methode im Sinne einer fraktionierten Fällung mit Molybdat-Vanadat eingeengt. Noch mehr aber wird durch die zusätzlich zur fraktionierten Ausfällung von Oberst angegebene vorhergehende umständliche Isolierung des Mo. aus dem Harn durch mehrfaches Extrahieren aus alkalischer Lösung, Lösen des Rückstandes in saurer Lösung und Ausschüttelung störender Substanzen aus dieser — aus der bekanntlich Mo. nicht extrahiert werden kann — eine Eliminierung der den Nachweis störenden Substanzen erreicht.

Durch die genannten Modifikationen ist die im Prinzip einfache und schnell durchführbare ursprüngliche Methode in einem derartigen Umfange kompliziert worden, daß die Methode nur noch in der Hand eines geübten, mit der Materie vertrauten Fachmannes befriedigende Ergebnisse zu zeitigen vermag. Für die routinemäßige Durchführung in der Praxis des klinischen Laboratoriums hat sich die modifizierte nephelometrische Mo.-Methode bisher noch nicht bewährt.

Naturgemäß wird ein quantitativer Mo.-Nachweis nach der ursprünglichen Deckertschen Vorschrift wegen möglicher Verunreinigungen des Urins immer problematisch sein. Bereits ganz banale Medikamente, wie Pyramidon und Phenacetin, die in vielen Mischpräparaten vorliegen, stören den Nachweis. In eigenen Untersuchungen konnten wir als störend neu die folgenden Substanzen hinzufinden: Supronal, Cliradon, Dicodid, Phenacetin, Veronal und Polamidon, von denen die beiden letzten allerdings nur in extrem hohen Dosen, wie sie bei Intoxikationen im Harn vorliegen dürften, störend wirken. Aufgabe der vorliegenden

Arbeit war es, eine Modifikation der ursprünglichen Deckertschen Methode ausfindig zu machen, die unter Wahrung des einfachen und schnell ausführbaren Charakters der Methode — darin liegt der besondere Wert für die praktischen Belange des klinischen Labors — die die Reaktion störenden Substanzen optimal eliminiert.

Keine der bisher bekannt gewordenen Modifikationen der Deckertschen Methode bediente sich einer für das Mo. unbedingt spezifischen Eigenschaft, nämlich der unterschiedlichen Löslichkeit der freien Alkaloidbase in Essigester (Essigäther, Äther aceticus) und Äther (Diäthyl-Äther). Zwar gibt schon Marquis eine Ausschüttelung mit Äther bei seinem qualitativen Mo.-Nachweis an. Der Autor war sich jedoch anscheinend nicht ganz klar über die Ätherlöslichkeit des Mo., da er strikt angibt, nur in saurem Milieu auszuschütteln. Während die freie Mo-Base in Essigester relativ gut löslich ist, ist dieselbe in Äther praktisch unlöslich. Das Studium dieser „praktischen" Unlöslichkeit der Mo.-Base in Äther war der Gegenstand unserer Voruntersuchungen.

In verschiedenen Versuchen wurden zu 10 cm³ Normalharn, der nach Deckert untersucht keine Trübung ergab, jeweils 100 γ Mo.-hydrochl. zugesetzt und vor der laut Vorschrift erfolgenden Ausschüttelung mit Essigester zweimal (einmal vor und einmal nach der Alkalisierung mit Na-Bikarbonat) mit je 20 cm³ Äther 0,5 min lang ausgeschüttelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Das Mittel von 57,2% Mo. lediglich nach der Vorschrift von Deckert stimmt sehr gut mit den Ergebnissen von Deckert und anderen Autoren überein, wonach das Mo. durchschnittlich zu 60% bei einmaliger Extraktion mit Essigester wiedergefunden wird. Bei zweimaliger vorheriger Äther-Ausschüttelung gehen durchschnittlich 6,7% Mo. verloren.

Tabelle 1. *Von 100 Gamma Morphinhydrochlorid je 10 cm³ normalem Harn zugesetzt wiedergefundene Mengen ohne und mit Einschiebung einer zweimaligen Äther-Ausschüttelung bei der nephelometrischen Methode nach* Deckert.

	Ohne Äther-Ausschüttelung		Nach Äther-Ausschüttelung vor und nach dem Alkalisieren	
1.	55 Gamma		50 Gamma	
2.	60		48	
3.	60		52	
4.	58		51	
5.	57	Im Durchschnitt	49	Im Durchschnitt
6.	55	57,2 Gamma	50	50,5 Gamma
7.	55		52	
8.	55		52	
9.	57		50	
10.	60		51	

In anderen Proben wurden zu 10 cm³ Normalharn je 500 γ Mo.-hydrochl. zugesetzt. Wiederum wurde zweimal mit Äther ausgeschüttelt. Diesmal wurde der Äther-Extrakt jedoch nicht verworfen, sondern beide Äther-Portionen vereinigt, der Äther abgedampft und der Rückstand mit Essigester aufgenommen. Diese Essigester-Lösung wurde dann nach DECKERT behandelt. Dabei fanden wir im Durchschnitt 30 γ Mo.-hydrochl. wieder, also ebenfalls etwa 6% des vorgelegten Mo.; ein solcher Betrag ist für die eigentliche Bestimmung praktisch ohne Belang. Dies gilt um so mehr, als durch die einmalige Essigester-Ausmittelung, wie sie DECKERT vorschreibt, nur etwa 60% des Harn-Mo. ermittelt werden; lediglich der Umrechnungsfaktor, Menge Urin-Mo./Mo.-Menge nach DECKERT würde sich im Verhältnis $\frac{100}{60} : \frac{100}{54}$ geringfügig verändern.

Schon aus der Literatur mußten wir zu der Schlußfolgerung kommen, daß eine ganze Reihe von Substanzen, die die DECKERTsche Methode stören, auf Grund ihrer Ätherlöslichkeit durch das Einschieben einer einmaligen Ätherausschüttelung nach Alkalisieren des Harnes mit Bikarbonat vollständig zu eliminieren waren.

Die für die DECKERTsche Methode absolut unwesentliche Ausschüttelung des Harnes aus *saurer* Lösung wird der Sicherheit halber mit durchgeführt, um auf diesem Wege bereits saure und neutrale Störsubstanzen des normalen, pathologischen oder unter einer eventuellen klinischen Medikation veränderten Harnes vorweg zu eliminieren. Die zweimalige Äther-Ausschüttelung beeinträchtigt die Einfachheit der nephelometrischen Methode nur unwesentlich. Wir sahen dabei niemals eine Emulgierung des Harns. Die Äther-Lösung schied sich in unseren zahlreichen Untersuchungen immer spätestens innerhalb von 30 sec ab und konnte so spielend von dem zu untersuchenden Harn wieder getrennt werden.

Wir gingen nunmehr daran, systematisch Substanzen zu untersuchen, von denen bekannt ist, daß sie die nephelometrische Mo.-Bestimmung nach DECKERT stören, oder die wir im Laufe unserer Untersuchungen als störend gefunden haben. Dabei wurden im allgemeinen dem Harn Mengen zugesetzt, die sich oberhalb der nach therapeutischen Dosen zu erwartenden bewegten. Bis auf die Äther-Ausschüttelung hielten wir uns streng an die DECKERTsche Vorschrift. Die Trübung der einzelnen Proben wurde mittels des Pulfrich-Stufenphotometers gemessen und die Mo.-Mengen aus der Eichkurve, die mit bekannten Mo.-Mengen bis 100 γ gewonnen wurde, abgelesen. Im einzelnen gestalteten sich die Untersuchungen folgendermaßen:

Zuerst wurde der Harn allein untersucht. Entstand keine Trübung, dann wurde zu 10 cm³ desselben Harns die störende Substanz allein zugesetzt und bestimmt, wieviel Mo. von derselben vorgetäuscht wird. Sodann wurden dem Harn neben der gleichen Menge Störsubstanz jeweils 100 γ Mo.-hydrochl. zugegeben und sowohl Harn-Störsubstanz als auch Harn-Störsubstanz + Mo. einmal ohne und einmal mit Äther-Ausschüttelung nach DECKERT bestimmt. Bei all diesen Untersuchungen

konnten wir feststellen, daß der Rückstand in den Porzellanschälchen nach vorheriger Äther-Ausschüttelung immer sauberer war als nach Essigester-Ausschüttelung allein.

Tabelle 2. *Nephelometrische Morphin-Bestimmung in Gegenwart bekannter Störsubstanzen mit und ohne zweimalige vorherige Äther-Ausschüttelung.*

Untersuchte Störsubstanz	vorgelegte Menge in 10 cm³ Harn	stört Dekkert'sche Methode	vorgetäuschte Morphin-Menge in Gamma	Verhalten nach vorheriger Äther-Ausschüttelung	von 100 Gamma Morph. wurden wiedergefunden
Eiweiß	5 cm³ Serum zu 5 cm³ Urin	+	25	stört nicht mehr	51
Chinin	100 γ	++	50	stört nicht mehr	50
Cocain	100 γ	++	45	stört nicht mehr	49
Nicotin	100 γ	—	—	—	50
Dolantin . . .	5 mg	++	40	noch 8—10	55
Polamidon* . .	1 mg	(+)	10	stört nicht mehr	50
Cliradon . . .	1 mg	+	27	stört nicht mehr	50
Pyramidon . .	1 mg	+	25	stört nicht mehr	48
Aspirin	100 mg	—	—	—	49
Phenacetin . .	5 mg	+	20	stört nicht mehr	49
Coffein	1 mg	—	—	—	51
Luminal . . .	5 mg	—	—	—	50
Phanodorm . .	40 mg	—	—	—	50
Veronal	40 mg	(+)	10	stört nicht mehr	49
Dilaudid . . .	100 γ	+	25	stört nicht mehr	51
Eukodal . . .	100 γ	+	25	stört nicht mehr	50
Apomorphin .	100 γ	—	—	—	52
Paracodin . . .	100 γ	—	—	—	48
Codein	100 γ	+	20	stört nicht mehr	50
Dicodid	100 γ	++	30	stört nicht mehr	51
Prontosil . . .	50 mg	—	—	—	49
Supronal** . .	100 mg	++	45	++45	75

* Stört nur in extrem hohen Dosen, die therapeutisch nicht vorkommen.

** Sehr hohe Dosis, stört aber auch in kleineren Dosen, wobei geringere Mengen Mo. vorgetäuscht werden. In therapeutischen Dosen wird Mo. nur in Mengen von der Größenordnung der Fehlerbreite vorgetäuscht.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Von den Substanzen, die bereits als störend bekannt waren, konnten Chinin, Cocain, Pyramidon, Dilaudid, Eukodal, Codein und Eiweiß vollkommen, Dolantin bis auf Mengen, die in die Fehlerbreite der Methode fallen, eliminiert werden, wenn eine zweimalige Äther-Ausschüttelung vorausgeschickt wurde. Fast sämtliche von uns zusätzlich als störend gefundenen Substanzen, nämlich Phenacetin, Cliradon, Dicodid und Veronal (das übrigens nur in ganz hohen Dosen stört) fallen nach der Äther-Ausschüttelung als Störsubstanzen fort. Nur bei Supronal konnte kein Effekt erzielt werden; jedoch täuschen therapeutische Dosen davon nur Mo.-Mengen vor, die im Bereich der Fehlerbreite der Methode liegen.

Tabelle 2 bringt die Bestätigung, daß eine vorherige Äther-Ausschüttelung den nephelometrischen Mo.-Nachweis nach Deckert in bezug auf seine Spezifität wesentlich verbessert, seine Einfachheit aber nur unwesentlich beeinträchtigt. Selbst die nächsten Verwandten des Mo., wie Eukodal, Dilaudid, Codein und Dicodid konnten mit der von uns angegebenen Modifikation spielend entfernt werden.

Zusammenfassung.

Es wurde gefunden, daß die Spezifität der nephelometrischen Morphin-Bestimmung nach Deckert durch eine zweimalige Äther-Ausschüttelung vor und nach dem Alkalisieren mit Bikarbonat wesentlich verbessert werden kann, ohne daß die im klinischen Laboratorium so wertvolle Einfachheit der Methode beeinträchtigt wird.

Literatur.

Autenrieth-Bauer: Auffindung der Gifte. Berlin 1943. — Deckert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **180**, 656 (1936). — Z. anal. Chem. **112**, 241 (1938). — Oberst: J. Labor. a. Clin. Med. **24**, 318 (1938). — J. of Pharmacol. **74**, 37 (1942).

Dr. Dr. P. Seifert, Heidelberg, Institut für gerichtliche Medizin, Voßstraße 2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 202—210 (1952).

Aus dem chemischen Laboratorium* der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Direktor: Professor Dr. med. H. Bennhold).

Ein neues Verfahren zur colorimetrischen Schnellbestimmung von Pyramidon im Serum.

Von

Friedrich Lohss und Ekkehard Kallee**.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. August 1951.)

Zum qualitativen Nachweis von Pyramidon sind mehrere Methoden bekannt geworden. Diese sind bei A. Heffter[1] und R. Kobert[2] zusammengestellt. Eine quantitative kolorimetrische Auswertung dieser Methoden gelang bisher nicht.

Brodie und Axelrod[3] führten 1950 quantitative Pyramidonbestimmungen mit dem Spektrophotometer nach Beckman durch direkte Messung der UV-Spektren zwischen 220 und 290 mμ aus. Im gleichen Jahr wurde durch R. Pulver[4] ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Pyramidon in biologischem Material mitgeteilt. Nach der Methode von Pulver werden die Eiweißkörper durch Kochen gefällt, das Pyramidon mit Äther aus der alkalischen wäßrigen Lösung extrahiert; nach der Eindampfung entsteht durch Behandeln mit diazotiertem p-Nitranilin in Gegenwart von Sulfaminsäure bei p_H 5—6 eine stabile gelbe Farbe, die eine quantitative Bestimmung ermöglicht.

Angesichts der großen Bedeutung des Pyramidons als Pharmakon erschien die Ausarbeitung einer einfacheren Bestimmungsmethode wünschenswert, zumal für Serienbestimmungen.

Im Verlauf unserer Untersuchungen fanden wir, daß bei Ausfällung der Eiweißkörper durch Pikrinsäure das Pyramidon im Filtrat direkt bestimmt werden kann. Bei Einwirkung von Sulfanilsäure und Natriumnitrit entsteht in stark saurem Milieu ein stabiler orangeroter Farbstoff, dessen Intensität der Pyramidonkonzentration entspricht. Bei näherer Untersuchung der bei dieser Reaktion entstehenden gefärbten Produkte erwiesen sich diese nicht identisch mit den von R. Pulver beschriebenen.

I. Diskussion der Versuchsergebnisse.

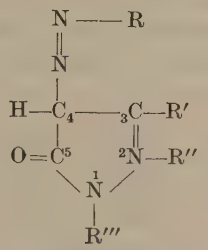
A. Zur Reaktion.

Pulver äußert die Vermutung, daß die von ihm beschriebene Reaktion keine normale Diazotierung sei. Nach Pulver stellt das Pyramidon keine kupplungsfähige Substanz dar. Nach Schultz[5] ist jedoch

* Wir danken dem Leiter des Laboratoriums, Herrn Dr.-Ing. G. Hillmann, für seine Unterstützung.

** Die *Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft* unterstützte diese Arbeit mit einer Sachbeihilfe.

die Kupplung von Diazoverbindungen mit Pyrazolonabkömmlingen prinzipiell möglich:



Zahlreiche lichtechte Farbstoffe dieser Art waren schon um die Jahrhundertwende bekannt; ihre Farbe ist meist gelb, vereinzelt orange oder rot.

Bei der von uns gefundenen Reaktion von Pyramidon mit Sulfanilsäure, Nitrit und Pikrinsäure in saurem Milieu entsteht, ebenso wie bei Pulver, kein einheitlicher Farbstoff, sondern ein Gemisch. Innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 0,3—20 mg% Pyramidon ist jedoch das Lambert-Beersche Gesetz gültig.

Bei der Chromatographie über anionotropes Aluminiumoxyd (vgl. Versuchsteil Nr. 1) erhielten wir mindestens sechs verschiedene Farbkomponenten, deren Hauptanteil auf der Säule orangefarben erscheint. Die Spektralanalyse der letzteren, chromatographisch abgetrennten Komponente ergab ein Absorptionsmaximum bei 420 mμ. Es entstehen bei der von uns beschriebenen Reaktion vorwiegend rote, wasserlösliche Farbstoffe, während die von Pulver beschriebenen hauptsächlich gelb und chloroformlöslich sind.

Eine analoge, quantitativ faßbare Farbreaktion entsteht in saurem Milieu auch ohne Pikrinsäure, also im Gemisch aus Pyramidon, Sulfanilsäure und Natriumnitrit in der Hitze. Für eine ausreichende Stabilisierung dieser Reaktion ist jedoch Pikrinsäure erforderlich.

Folgende sechs Faktoren wurden in ihrem Einfluß auf die Reaktion und die Höhe der Extinktion untersucht (die jeweiligen Ansätze sind im Versuchsteil II ersichtlich):

1. Sulfanilsäurekonzentration,
2. Natriumnitritkonzentration,
3. Pikrinsäurekonzentration,
4. Wasserstoffionenkonzentration,
5. Eiweißkonzentration,
6. Temperatur.

ad 1.:

Die Zunahme der Extinktion bei mehr Sulfanilsäure als 38,1 Mol auf 1 Mol Pyramidon ist nur noch gering, wie aus Abb. 1 hervorgeht.

ad 2.:

Die optimale Natriumnitritkonzentration entspricht einem Molverhältnis Natriumnitrit:Pyramidon = 19:1 (Abb. 2). Dies entspricht der halben Molkonzentration von Sulfanilsäure. Bei höherer Nitritkonzentration sinkt die Extinktion.

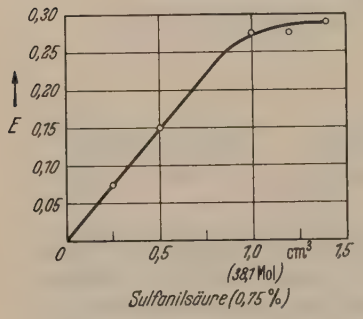


Abb. 1.

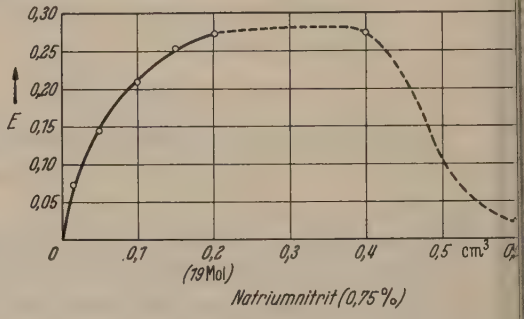


Abb. 2.

Abb. 1. Abhängigkeit der Extinktion von der Sulfanilsäurekonzentration bei 15 mg% Pyramidon.
Abb. 2. Abhängigkeit der Extinktion von der Natriumnitritkonzentration bei 15 mg% Pyramidon.

ad 3.:

a) Pikrinsäurezusatz erhöht die Extinktion in fast linearer Abhängigkeit (vgl. Abb. 3). Ähnliche Resultate werden auch ohne Pikrinsäure in abgestufter Wassermenge erhalten. Eine exakte Messung ist jedoch wegen der Instabilität der Farbe nicht möglich.

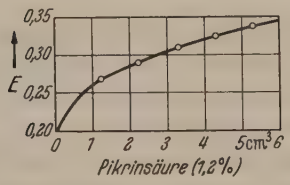


Abb. 3.

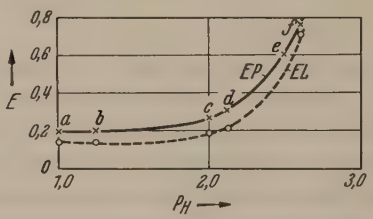


Abb. 4.

Abb. 3. Extinktion in Abhängigkeit von der Pikrinsäurekonzentration bei 20 mg% Pyramidon.
Abb. 4. Abhängigkeit der Extinktion von der Wasserstoffionenkonzentration bei 2 mg% Pyramidon.
EL = Extinktion der Leerwerte,
EP = Extinktion mit Pyramidon.

b) Pikrinsäure stabilisiert die Reaktion. Über die geringe Zunahme der Farbintensität nach dem Kochen wird auf Abschnitt I, 6 verwiesen.

c) Pikrinsäure fällt das Eiweiß und führt das Pyramidon in das Filtrat über, beides in einem Arbeitsgang.

d) Das p_H von Pikrinsäure (1,2%, gesättigt) liegt nach unseren Messungen bei 1,4 (Glaselektrode); dieses p_H entspricht fast der optimalen Wasserstoffionenkonzentration der Reaktion.

ad 4.:

Die Spezifität der Reaktion ist durch die Wasserstoffionenkonzentration bedingt. Wird ein p_H von 4,0 erreicht, so besteht zwischen Leerwert ohne Pyramidon und dem entsprechenden Versuch mit Pyramidon kein Unterschied mehr. In Abb. 4 wird gezeigt, daß für Werte von 2 mg% Pyramidon die maximale Extinktion bei einem p_H von etwa 2,4 liegt, jedoch ist hier die Farbreaktion nicht so stabil wie bei p_H-Werten zwischen 1 und 2. Im letzteren p_H-Bereich läßt sich die Empfindlichkeit der Reaktion durch Puffer nach Belieben einstellen, insbesondere für Werte unter 3 mg%. Wir hatten diesen Weg zunächst mit Natriumacetat, später mit Natriumcitrat eingeschlagen.

Das Serumfiltrat hat ein p_H von etwa 3,0. Durch empirisch gefundenen Zusatz von Natriumzitratpuffer mit n-HCl wurde die Reaktion aus Serum auf p_H 1,2—1,3 (Glaselektrode), die aus wäßriger Lösung auf p_H 1,1 eingestellt. Dieses Milieu wurde gewählt, weil die Empfindlichkeit von 40 Skalenteilen am Havemann-Colorimeter pro 1 mg% Pyramidon für niedere Werte als ausreichend erachtet wird. Außerdem sind so die Extinktionen bei Pyramidonbestimmungen aus Eiweiß- und aus wäßriger Lösung fast identisch.

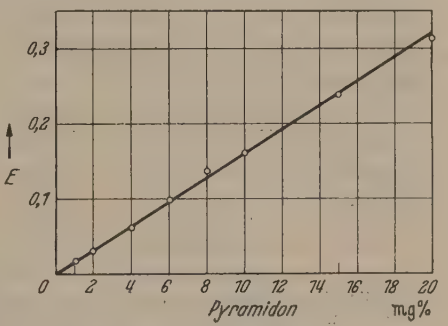


Abb. 5. Extinktionen bei extrem saurer Reaktion.

Brauchbare Resultate und sehr stabile Farbreaktionen erzielten wir auch (vgl. Abb. 5) bei einem p_H von 1,0 bzw. knapp darunter ohne Puffer. Jedoch sind zu diesem Verfahren 4,0 cm^3 Serum erforderlich. Die Extinktionen aus wäßriger Lösung und aus Serum sind in diesem Falle gleich.

ad 5.:

a) Durch Pikrinsäureverlust bei der Eiweißfällung wird der Verlauf der Reaktion praktisch nicht beeinflußt.

b) Pyramidon wird durch Pikrinsäure quantitativ in das Filtrat übergeführt. Dies ergab sich aus Versuchen mit abgestufter Serumeiweißkonzentration. Bei einem Teil der jeweiligen Serumkonzentrationen wurde *vor*, bei anderen *nach* der Filtration Pyramidon zugesetzt. Bei niederen Pyramidonkonzentrationen zeigte sich kein, bei 12 mg% ein geringer Verlust an Pyramidon, der aber noch in der Fehlerbreite der Methode liegt.

c) Direktes und indirektes Bilirubin bewirken keine Störung, da sie auch im Leerwert erfaßt werden.

ad 6.:

Die Farbreaktion ist im kochenden Wasserbad nach 2 min praktisch beendet. Bei Zimmertemperatur erreicht sie nach 10 Std noch nicht den Endwert. Nach 5minütigem Kochen und Abschrecken in kaltem Wasser nimmt die Extinktion bei Zimmertemperatur nach 2 Std um durchschnittlich 3,5%, nach 4 Std um 5%, nach 10 Std um 9% zu. Unsere Werte wurden nach etwa 30 min abgelesen.

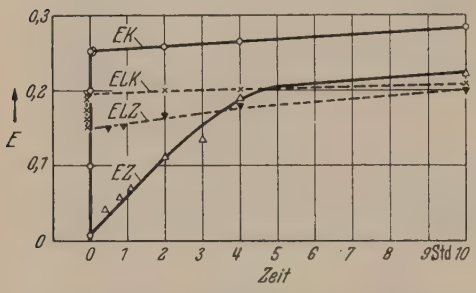


Abb. 6.

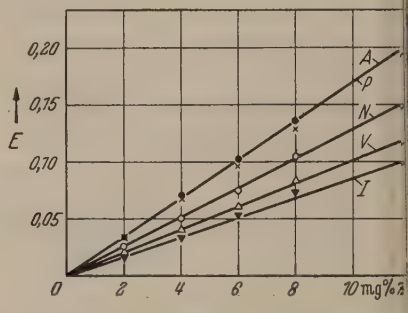


Abb. 7.

Abb. 6. Zunahme der Extinktion in der Zeiteinheit. ELK = Extinktion der Leerwerte in der Hitze, EK = Extinktion mit Pyramidon in der Hitze, ELZ = Extinktion des Leerwertes bei Zimmertemperatur, EZ = Extinktion mit Pyramidon bei Zimmertemperatur.
Abb. 7. Extinktionen in wäßriger Lösung von: P = Pyramidon, N = Novalgin, V = Vaditon, A = Aneuxol, I = Irgapyrin.

B. Zur Anwendbarkeit der Reaktion.

Mit pyramidonverwandtenStoffen haben wir einige orientierende Versuche unternommen.

a) Die Reaktion ist auf folgende Pharmaka nicht anwendbar:

1. Antipyrin (DAB 6), 1-Phenyl-2,3-dimethyl-pyrazolon(-5).
2. Salipyrin (Riedel-de Haen) 1-Phenyl-2,3-dimethyl-pyrazolon(-5). salicylic.
3. Saridon (Hoffmann-La Roche), 4-isopropyl-Antipyrin enthaltend.
4. Butazolidin-Na, 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin-Natrium (Bestandteil des Irgapyrins-Geigy).
5. Melubrin (Farbw. Hoechst), Antipyrin-4-amino-N-methansulfosaures Natrium, fällt bei dem vorliegenden p_H aus. Es entsteht mit Diazoreagens ein roter Farbstoff, der in neutraler wäßriger Lösung nicht, jedoch in Chloroform löslich ist. Auch chromatographisch verhält er sich anders als die in II, 1 angeführten Farbkörper.
6. 4-Acetylamino-antipyrin (Farbw. Hoechst).

b) Für die unten genannten Präparate ist eine quantitative Bestimmung möglich. Als Ausgangsmaterial für Nr. 3—5 standen uns bisher nur handelsübliche Ampullen zur Verfügung, deren Reinheitsgrad uns nicht bekannt ist (vgl. Abb. 6):

1. Pyramidon (DAB 6), 4-Dimethylamino-1-phenyl-2,3-dimethyl-pyrazolon(-5).
2. Novalgin (Bayer und Farbw. Hoechst), 1-Phenyl-2,3-dimethylpyrazolon(-5)-4-N-methylamino-N-methansulfosaures Natrium.
3. Vaditon (Promonta), ascorbinsaures Pyramidon.
4. Aneuxol (Brunnengräber), Pyramidon-hydrochlorid.
5. Irgapyrin (Geigy), 15% Pyramidon + 15% Butazolidin-Na in wäßriger Lösung. Bei diesem Präparat reagiert nur die Pyramidonkomponente. Die Butazolidinkomponente fällt durch Pikrinsäure und bleibt bei Versuchen aus Serum mit den Eiweißkörpern im Filterrückstand.
6. 4-Amino-antipyrin (Farbw. Hoechst). Dieses ist nach Brodie und Axelrod[3] das erste Abbauprodukt des Pyramidons mit pharmakologischer Wirksamkeit, wogegen das oben angeführte 4-Acetyl-amino-antipyrin als zweite Abbaustufe pharmakologisch wirkungslos sein soll.

Als Beispiel einer Anwendung der Methode seien zum Abschluß noch einige Versuche mitgeteilt, bei denen der Blutspiegel von sechs gesunden erwachsenen Personen nach Injektion von Novalgin (Bayer) i. v. über die Zeit von 2 Std verfolgt wurde.

Tabelle 1.

Lfd. Nr.	Zeitpunkt der Blutentnahme nach Injektion:	Novalginspiegel in mg%, bei den Versuchspersonen: L.: (70 kg)	K.: (59 kg)	B.: (60 kg)	O.: (68 kg)	Mau.: (65 kg)	S.: (87 kg)
1.	sofort	10,7	11,7	15,1	9,9	14,0	5,7
2.	15 min	4,2	4,8	5,8	2,8	6,2	2,8
3.	30 min	2,5	2,6	3,7	2,5	3,0	2,7
4.	60 min	0,7	1,5	2,1	2,0	2,7	2,8
5.	120 min	0	1,0	0,9	1,4	2,1	2,5

II. Durchführung der Versuche.

1. *Auftrennung der Farbstoffe.*

12,13 g (= 7 Mol) Sulfanilsäure (p. a., Merck) und 20,8 g (= 9,1 Mol) Pikrinsäure (p. a., Merck) wurden zusammen in 2 l Wasser heiß gelöst. Dann wurden 2,31 g (= 1 Mol) Pyramidon (DAB 6) in 100 cm^3 Wasser zugefügt und das Gemisch unter ständigem Rühren tropfenweise mit 4,16 g (= 6,1 Mol) Natriumnitrit (p. a., Merck) in 100 cm^3 Wasser versetzt. Danach wurde 4 min im Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen die dunkelrot gefärbte Lösung i. vac. auf etwa 250 cm^3 eingedickt. Die ausgefallenen Krystalle wurden abfiltriert, das Filtrat mit 70 cm^3 n-HCl angesäuert und nacheinander mit Chloroform und Äther ausgeschüttelt, bis der Äther farblos blieb.

Die wäßrige Phase wurde i. vac. über Natriumhydroxyd und Silicagel getrocknet. Es blieb ein schwarzroter, amorpher Rückstand, welcher sehr leicht löslich in Wasser war, leicht löslich in Alkohol, Butanol, Isoamylalkohol, unlöslich in anderen organischen Lösungsmitteln wie Äther, Chloroform, Benzol, Toluol. Die Chromatographie dieses Rückstandes aus wäßriger Lösung über anionotropes Aluminiumoxyd und Entwicklung mit 0,6%iger NaCl-Lösung ließ 3 Farbkomponenten erkennen, von oben nach unten Orange, Rot und Gelb. Die Hauptkomponente war orangefarben. Sie wurde mit dem Spatel aus der Chromatographiesäule abgetrennt, mit 1%igem heißem Ammoniakwasser eluiert und das Eluat i. vac. über Schwefelsäure getrocknet. Der Rückstand stellte ein amorphes, in Wasser sehr leicht, in Äthanol weniger lösliches Pulver dar, das bei nochmaliger Chromatographie aus einem einzigen Farbring bestand. Die Spektraluntersuchung* ergab eine Absorptionsbande zwischen 300 und 560 mμ mit einem Maximum bei 420 mμ.

Die Chloroform- und Ätherextrakte enthielten neben sehr viel unveränderter Pikrinsäure geringe Mengen von 4 chromatographisch abtrennbaren roten, braunen und gelben Farbstoffen. Pyramidon und Sulfanilsäure konnten nicht mehr gefunden werden.

2. Als *Standardmethode* wurde folgende Vorschrift ausgearbeitet:

A. Bestimmung in eiweißhaltigem Material:

α) *Reagentien:*

a) 3 cm³ Serum pro Einzelbestimmung
b) gesättigte (1,2%ige) wäßrige Pikrinsäurelösung
c) 0,75%ige Sulfanilsäure, heiß in Wasser gelöst
d) 0,75%ige wäßrige Natriumnitritlösung
e) Citronensäure-Salzsäure-Puffer:

Lösung A: Natriumcitrat nach Sörensen A:
21,008 g Citronensäure
200 cm³ n-NaOH
Aqua dest. ad 1000,0 cm³

Lösung B: n-HCl

Puffergemisch: Lösung A + B = 16 + 7.

β) *Ausführung:*

a) 3,0 cm³ Serum und 9,0 cm³ Pikrinsäurelösung werden in einem 25 cm³-Erlenmeyerkolben gemischt, mehrmals geschüttelt und dann filtriert (Filter Schleicher & Schüll 602 E. H.).
b) 7,0 cm³ Filtrat werden im Reagenzglas mit 2,5 cm³ des Citronensäure-Salzsäurepuffergemischs, dann mit 1,2 cm³ Sulfanilsäurelösung versetzt. Nach Zusatz von 0,2 cm³ Natriumnitritlösung und Durchmischung erfolgt
c) 5-minütiges Kochen im Wasserbad. Die Farbreaktion ist nun beendet.
d) Anschließend wird im kalten Wasserbad abgeschreckt und bei Zimmertemperatur im Havemann-Kolorimeter mit 10-mm-Küvette bei Filterkombination VG 9 (grün) + BG 7 (blau) (Schott & Gen., Jena) abgelesen.

* Wir danken Herrn Dr. Dannenberg vom Max-Planck-Institut für Biochemie für die Durchführung der Spektraluntersuchung mit dem Beckman-Spektrophotometer.

e) Als Blindwert wird dasselbe Serum *vor* Pyramidonapplikation benützt und nach β, a—d behandelt.

Anmerkung: Die Ansatzmenge von 10,9 cm³ entspricht dem Inhalt der 10-mm-Cüvette des HAVEMANN-Colorimeters. Bei Anwendung anderer Meßverfahren kann im entsprechenden Verhältnis variiert werden.

B. Bestimmung in wäßriger Lösung:

a) 1,75 cm³ wäßrige Pyramidonlösung werden mit 5,25 cm³ Pikrinsäurelösung gemischt (entsprechend 7,0 cm³ Filtrat von 2Aβ).

b) Der weitere Analysengang entspricht den Ziffern 2Aβ, b—d. Der Blindwert enthält statt Leerserum 1,75 cm³ Wasser.

3. Bei diesem Verfahren ergeben sich folgende Eichkurven, die bis zu 15 mg% Pyramidon aus Wasser und Serum fast identisch sind (Abb. 8). Über 20 mg% weichen *beide* Kurven etwas abszissenwärts ab. Zwischen 2 und 12 mg% beträgt die Streuung bei 2A ± 7,5%, bei 2B ± 5%.

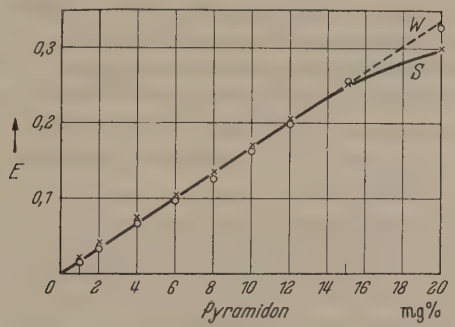


Abb. 8. Eichkurven zur Pyramidonbestimmung aus Serum (= S) und Wasser (= W).

4. *Ansatz zu Abb. 1:*

Der Ansatz entspricht der Methode II2B. Sulfanilsäure wurde variiert, die Gesamtmenge mit Wasser auf 10,9 cm³ aufgefüllt. Die Leerwerte enthielten kein Pyramidon, waren sonst entsprechend.

5. *Ansätze zu Abb. 2 und 3:*

entsprechen sinngemäß dem Ansatz zu Abb. 1; es wurde die Natriumnitritkonzentration variiert. Das gleiche Prinzip liegt der *Abb. 3* zugrunde; es wurde die Pikrinsäurekonzentration variiert.

6. *Ansatz zu Abb. 4:*

Es wurden bei allen Versuchen Seren, 2 mg% Pyramidon enthaltend, verwendet, ausgenommen die Leerwerte.

Versuch a entspricht II7.

Versuch b entspricht der Originalmethode II2A.

Die Versuche c—f haben folgenden Ansatz (Gesamtvolumen wie bei II2A):

A) 3,0 cm³ Serum,

B) 9,0 cm³ Pikrinsäure,

C) vom Filtrat aus A + B ein aliquoter Teil von 7,0 cm³,

D) 1,4 cm³ Diazo-Reagens: I + II = 7,5 + 2,5 cm³

Diazo I: 0,75%ige wäßrige Sulfanilsäurelösung mit 10,0 cm³ $HCl_{konz.}$ auf 1000,0 cm³,

Diazo II: 0,75%ige Natriumnitritlösung.

E) Natriumcitrat nach Sörensen A variiert, Versuch c = 0; d = 0,1; e = 0,3; f = 0,5 cm³. Die Leerwerte wurden erst abgelesen und dann kompensiert.

7. *Ansatz zu Abb. 5:*

a) 4,0 cm³ Serum,
b) 12,0 cm³ Pikrinsäure,
c) vom Filtrat aus a + b ein aliquoter Teil von 9,5 cm³,
d) Diazoreagens 2,0 cm³. Reagens wie bei 6D, doch enthält hier die Sulfanilsäurelösung 45,0 cm³ $HCl_{konz.}$ auf 1000,0 cm³,
e) Kochzeit 5 min.

8. Die *Ansätze zu Nr. 15b* waren folgende:

4 Seren mit 1,1—7,2% Eiweißgehalt (nach Kjeldahl) wurden aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde *vor* Filtration, die andere *danach* mit der entsprechenden Menge Pyramidon beschickt, so daß sich Konzentrationen zwischen 2,0 und 12,0 mg% ergaben. Die weitere Bestimmung entsprach II2A.

9. Die *Ansätze zu Abb. 6* entsprechen II2B. EK und ELK wurden 30 sec bis 5 min gekocht, anschließend bei Zimmertemperatur stehen gelassen und die Zunahme der Extinktion nach verschiedenen Stunden gemessen. ELZ und EZ wurden nicht gekocht, sondern bei Zimmertemperatur nach verschiedener Zeit gemessen.

10. *Abb. 7* hat Ansätze, die der Methode II2B entsprechen; nur bei der Irgapyrinbestimmung wurde nach II2A verfahren. Als Stammlösungen wurden handelsübliche Ampullen benutzt.

11. 5 gesunden Versuchspersonen wurden je 3,0 cm³ Novalgin (Farbwerke Hoechst), einer weiteren Versuchsperson (B.) 3,5 cm³ i.v. injiziert (Zeitdauer der Injektion etwa 5 min.). Unmittelbar danach wurde aus der Vene des anderen Armes Blut entnommen, weitere Blutentnahmen erfolgten nach 15, 30, 60 und 120 min. Das Novalgin wurde nach II2A bestimmt.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Farbreaktion beschrieben, die eine colorimetrische Schnellbestimmung von Pyramidon im Serum und in wäßrigen Lösungen ermöglicht. Für Bestimmungen im Urin ist diese in der vorliegenden Form nicht anwendbar.

2. Der Einfluß von Sulfanilsäure, Natriumnitrit, Pikrinsäure sowie derjenige der Wasserstoffionenkonzentration auf die Farbreaktion werden besprochen.

3. Die Anwendung auf weitere pyramidonähnliche Stoffe wird geprüft.

4. Als Beispiel einer praktischen Anwendung der Reaktion wird der Novalginblutspiegel einiger gesunder Personen untersucht.

Literatur.

[1] Rohde, E., in: A. Heffter, Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Berlin, **1923**, Bd. I, S. 1139. — [2] Kobert, R.: Z. klin. Med. **62**, 68 (1907). — [3] Brodie, B. B., and J. Axelrod: J. of Pharmacol. **97**, 171 (1950). — [4] Pulver, R.: Arch. internat. Pharmacodynamie **81**, 47 (1950). — [5] Schultz, G., u. L. Lehmann: Farbstofftabellen, Leipzig, **1931**, Bd. I, S. 297.

Dr. Friedrich Lohss, Tübingen, Medizinische Universitäts-Klinik und Poliklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 211—213 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler).

Ein elektrisch gesteuertes Gasventil.

Von
H. F. Häusler und F. Lex.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 24. September 1951.)

Der eine von uns hat im Jahre 1936 einen einfachen Stoffwechselapparat für Kleintiere[1] beschrieben, welcher sich seither bewährt hat. Wir haben bereits damals dem Sauerstoffventil als einem der wichtigsten Teile der Apparatur besonderes Augenmerk geschenkt, um so mehr als die Schwierigkeiten von Ventilproblemen allgemein bekannt sind. Bekannt ist freilich auch, daß jede der vielen möglichen Konstruktionen Gutes leisten kann, woferne besonders die stark mechanisch beanspruchten Teile gediegen und die Gesamtausführung einwandfrei ist; so wurde beispielsweise damals von der Verwendung abzuklemmender Schläuche Abstand genommen und zu dem ausführlich beschriebenen Kegelventil übergegangen (S. 351/352), weil die Gummiqualität damals den Beanspruchungen nicht standhielt. Das damals[1] und das später[2] beschriebene, auch für Über- oder Unterdruckversuche verwendbare Ventil hat sich in unseren Konstruktionen entgegen anderen Ausführungen[3] auch bei längster Versuchsdauer als vollkommen verläßlich erwiesen, nur hatte bei dem nach dem Prinzip der elektrischen Hausklingel betriebenen Modell[2] der Lärm etwas gestört.

Wir hatten einige Zeit auch das von Lindner und Brauner[3] beschriebene Macek-Ventil in Verwendung, fanden es aber trotz seiner entschiedenen Vorteile vor allem wegen seines verhältnismäßig hohen Leistungsverbrauches, nämlich 10 Amp. bei 4 Volt, nicht ganz unseren Anforderungen entsprechend, auch als die Magnetspulen für eine Spannung von 24 Volt bei etwas geringerem Wattverbrauch umgewickelt wurden.

Mittlerweile gelang es uns, ein Gasventil in einer so handlichen und so betriebssicheren Form zu konstruieren, daß wir es nach hervorragender Bewährung in 2½jähriger Erprobung durchaus empfehlen können:

Das in der Abbildung dargestellte Kegelventil wird durch einen Elektromagneten gesteuert, der direkt auf den der Führung des Kegelventils aufgesetzten Anker wirkt. Seine Arbeitsweise spielt sich folgendermaßen ab: Sobald das Spirometer so weit entleert ist, daß der Quecksilberkontakt über die Zuleitung A geschlossen ist, fließt der Strom von Minus über die Leitung C, den Kontakt und die Leitung A in die im

Schaltschema als obere gezeichnete Magnetwicklung. Dadurch wird der Anker angezogen und das Ventil geöffnet. Der angezogene Anker schließt die beiden im Schaltplan oberen Steuerkontaktpaare, wodurch der Stromkreis über A und C infolge des so zustandekommenden Kurzschlusses stromlos wird und somit beim Öffnen kein Öffnungsfunke mehr erfolgt. Sobald das Spirometer aufgefüllt ist, wird der andere Quecksilberkontakt geschlossen, so daß nun der Strom von Minus über die Leitung C, den Quecksilberkontakt, die Leitung B und über das im Schaltplan untere Steuerungskontaktpaar in die im Schaltplan untere Wicklung des Elektromagneten fließt, welche der oberen Wicklung ent-

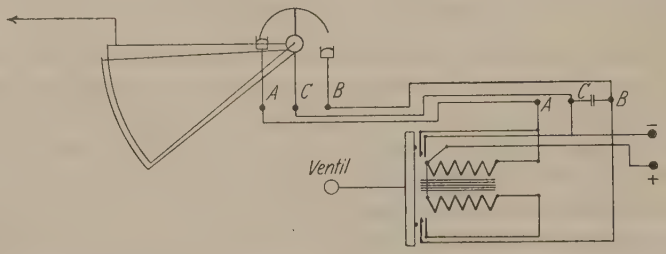


Abb. 1. Elektrisch gesteuertes Ventil. Feldspule: 2 × 1640 Wdg., 0,25 ∅ Cu L., 24 V = ‚0·92 A.

gegenwirkt. Dadurch wird ein Abfallen des Ankers erreicht, worauf das Ventil durch die in ihm enthaltene Druckfeder wiederum geschlossen wird. Zur Verhinderung der Funkenbildung an den Quecksilberkontakten wurde ein Kondensator von 4 μF parallel geschaltet. Ventil und Elektromagnet sowie die dazugehörigen Steckbüchsen (A, B, C) für die Anschlüsse der Leitungen zum Spirometer und für die Speisespannung von 24 V Gleichstrom wurden auf einer gemeinsamen Grundplatte (aus 1,5 mm starkem Aluminiumblech) montiert. Der Ventilmantel mit den dazugehörigen Schlauchanschlußstücken ist aus Messing, der Ventilkegel samt Führung aus Chromstahl, der Anker aus Weicheisen angefertigt. Auf den aus Blechlamellen zusammengesetzten Magnetkern sind die beiden Spulen aufgeschoben, deren jede 1640 Windungen eines Lackdrahtes von 0,25 mm Durchmesser enthält, was einer Betriebsspannung von 24 V Gleichstrom bei 0,92 A Stromstärke, also einem Verbrauch von 22 Watt entspricht. Die Apparatur kann selbstverständlich auch für Wechselstrom gebaut werden.

Das beschriebene Gasventil hat gegenüber anderen Konstruktionen folgende Vorteile: seine Gesamtgröße einschließlich Magnet beträgt 9,0 $\times$8,5$\times$6,1 cm, es ist mit Ausnahme der drei Spirometeranschlüsse verkapselt, dadurch vor Staub und mechanischer Beschädigung gesichert und kann in jeder gewünschten Lage sowie in beliebiger Entfernung von der Stoffwechselapparatur aufgestellt werden. Der temporäre Strom-

verbrauch des Elektromagneten, der ausschließlich während der Einfüllungszeit belastet wird, beträgt 22 Watt. Das Ventil arbeitet lärmfrei, bedarf keiner Wartung und besitzt eine hohe Druckfestigkeit, indem unsere Ausführung bei 2 atü noch vollkommen dicht hält. Seine Reibungsflächen sind auf ein Minimum reduziert, so daß infolge des dadurch verminderten Verschleißes die Haltbarkeit wesentlich verlängert ist. Daraus resultiert eine ausgezeichnete Betriebssicherheit, während $2\frac{1}{2}$ Jahren gab es weder Versager noch Abnützungserscheinungen.

Genaue Zeichnungen zwecks Anfertigung des Ventils können im Pharmakologischen Institut Graz angefordert werden.

Literatur.

[1] Häusler, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 345 (1936). — [2] Häusler, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **183**, 194 (1936). — [3] Lindner, A., u. F. Brauner: Z. ViHoFe **3**, 278 (1949/50).

Prof. Dr. H. F. Häusler, Pharmakol. Institut der Universität Graz (Österreich).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 214—226 (1952).

Department of Pharmacology University of Utah College of Medicine
Salt Lake City, Utah

Equidistance Concept and Structure-Activity Relationship of Curarizing Drugs.*

By
S. Loewe and S. C. Harvey.

With 2 figures.

(Eingegangen am 5. September 1951.)

I.

The chemical constitution of biological agents has many facets that may offer clues for the problems of structure-activity relationship (SAR[26, 27]), including the most fascinating one, that of selective activity. The spatial arrangement of the drug molecule represents only one part of the large multiplicity of these facets. Yet it comprises in itself a large tridimensional variety of structural properties. The possible SAR significance of such architectural properties, pointed out more than five decades ago by Emil Fischer and Paul Ehrlich, has been elaborated more recently by Haurowitz[12, 20] and Pauling[31].

Recent students of SAR[1, 2, 3, 21–23, 33, 35–38, 42, 43, 45], by confining the considerations of chemical properties to two or three presumably major "reactive groups" of certain agents and the considerations of spatial configuration to the linear distance between these groups, have placed emphasis on a streamlined, one-dimensional spatial-arrangement concept. The essential postulates of such an equidistance concept of SAR can be expressed as

$$RAD_{drug\ 1} = RAD_{drug\ 2} = RAD_{drug\ 3} = \ldots\ldots\ldots\ldots = RAD_{receptor}$$

where RA are atoms of a specified type of bonding reactivity, D is the linear distance between them, and drugs 1, 2, 3, etc., are agents equally and maximally potent in the biological action concerned. "Receptor" is the biological partner of the hypothetical chemical reaction assumed to be the correlate and/or initiator of the alteration of biological function, which is the expression of drug action. The receptor partner of reactions falling under the equidistance hypothesis carries RAs capable of reacting with those of the drug by virtue of bonding reactivity and mutual distance. The formula thus expresses that the distance at which the

* Extension of a paper given at Fall Meeting of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, Boston, Mass., November 13—15, 1950, and published in abstract form[28].

RAs are arranged in the receptor is the determinant of chemical selectivity, and the local and the physiological role of the receptor are the determinants of functional selectivity of the drug action*.

II.

Among various applications of this concept, that to curarizing drugs is attractive because of many interesting ramifications. From 1907 on, when WILLSTÄTTER and HEUBNER[44] described the first curarizing bis-trimethylammonium polymethylene (later abbreviated as C 4), more and more evidence accumulated which demonstrated that such "double-headers" can be more selective curares than comparable mono-ammoniums[1, 2, 31, 32, 33] which may be categorized as curare type I. Such facts can invite an equidistance hypothesis, and indeed BARLOW and ING had an equidistance concept in mind when they proposed to find those homologs of WILLSTÄTTER's and HEUBNER's bis-onium tetramethylene in which the two cationic heads were what they called "an optimal distance apart"[2]. It is now obvious that the investigations of ING's[1, 2], PATON's[30–33] and PFEIFFER's [22, 23, 35] groups and of more recent workers are a classical example of serendipity. They did not yield data on the *linear distance* of the reactive atoms; instead, they pointed to the fascinating possibility that curare activity is correlated to the *chain length* of the interjacence between the two reactive onium-nitrogen atoms and that highest potency is preferentially embodied in bis-oniums in which nine to twelve serially arranged atomic links can be counted as components of the interjacent chain. As shown in column 5 of Table 1, chains of such length indeed appear as the interjacences of one or more of the representatives of the four major types of curarizing bis-oniums. They constitute the single-row interjacences of some of the

* This formulation of the essence of SAR concepts based upon equidistance considerations is believed to be a correct presentation of those equidistance (ED) hypotheses whose authors have clarified their ideas by appropriate definitions, as well as a fair attempt of presentation of those ED hypotheses which lack such definitional clarification. — In one regard we have deviated from previous terminology. The expression "reactive atoms" is here employed where previous authors speak of "reactive groups". Even when one disregards that the reactivity of an atom always depends on factors contributed by the rest of the molecule, it is true that there are exceptional cases in which even an outstanding and critical bonding capacity is difficult to correlate with a single atomic component of the molecule, as for instance cases of resonance. On the other hand, such reactivity is rarely embodied in the entirety of a multi-atomic radical (= group); usually it is easy to point out the reactive atom within the reactive group. At any rate, reference to "reactive groups", when intramolecular distances are a major issue, introduces elements of ambiguity and arbitrariness. Indeed, whereas definite "distances of reactive groups" appear often in the literature, it is not often that the reader is told what parts of the "reactive groups" were selected as the starting and endpoints of the stretches measured.

simple bis-trimethylammonium polymethylenes ("Cn"; type II) and of related synthetics in which the cationic nitrogens are incorporated in more complicated heterocyclic heads (type V), and they can be found in one or both of the two interjacent rows in certain natural curares (types III and IV). Two types of this class of compounds with "two-row" interjacences can be distinguished according to whether the two chains which constitute the circular double-interjacence contain the same (type III) or an unequal number of links (type IV).

III.

If the similarity in the number of interjacent atomic chain links were found to be paralleled by a similarity in what Paton[30] called the "spatial location" of the reactive N-atoms, these drugs might indeed

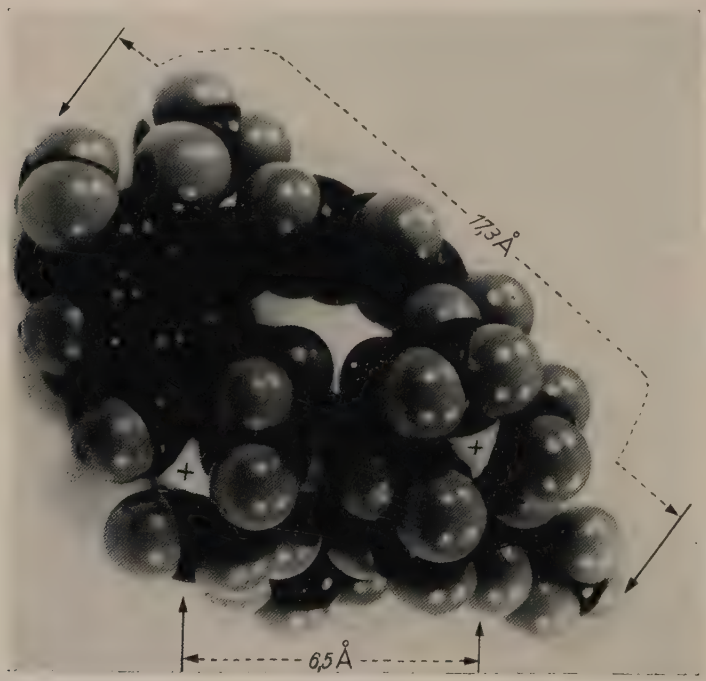


Figure 1. Molecular model of ($d-?$) tubocurarine. — The white atoms, marked with a "+", are the two onium nitrogens, their linear distance (RAD) being marked by the bracket below the picture. The bracket at the upper right marks the maximum diameter of the molecule.

offer support to the equidistance hypothesis. At least for the bis-oniums of types III and IV it is obvious in advance that chain length and RAD are rather unrelated. The roughly circular arrangement of their "two-row" interjacence imparts to these molecules the shape of a diadem

with two nitrogen "gems", as is illustrated in Figure 1, the molecular model of *d*-tubocurarine*. In such diadem structures RAD, being the length of a chord of the circle, is necessarily shorter than the length of the corresponding arc (= chain length). At any rate, for every endeavor to put the problematic parallelity to test it is prerequisite to determine the actual RAD. For this purpose, the linear RADs were measured in FISHER-HIRSCHFELDER models of representative curare agents. The values obtained are presented in Table 1, columns 7 and 8, together with other pertinent data.

It would be difficult to find a common denominator for curarizing potency in any set of values presented in Table 1. Even the ratios between RAD and curarizing potency (columns 10 and 11) lack uniformity. Above all, the N-to-N distance (columns 7 and 8) has no fixed value in any of these curares; it varies in every single model according to the vagaries of measurement, and the range of variation (column 9) is especially great in highly potent substances. This is due to the lack of rigidity of the interjacence (column 6), which is easily explained by the uninhibited rotations around a varying number of the bonds between the serially arrayed links of the interjacent row. A cardinal lesson taught by these measurements is that the length of a chain is not necessarily the measure of the straight distance between its endpoints and that a flexible connection between two points is not an appropriate device to keep them at a fixed distance apart. Accordingly it appears that, for substantiation of the equidistance (ED) hypothesis, compounds with an immovable, solid-frame interjacence are needed; such substances are not among the known curarizing bis-oniums.

The molecular models do not depict the strong cationic charges of the reactive atoms. However, this factor is implicitly considered in our measurements. If such charges cause a mutual repulsion of the reactive heads, which keeps them maximally apart, then their spatial location is expressed by the maximum RAD values measured (column 8). These maximum distances, too, differ from substance to substance, and for approximately equipotent curares in a range as wide as $\pm$ 49% (compare, for instance, substances No. 9 and 17 with No. 13 and 16). Therefore, until circumstances can be demonstrated by which an interjacent chain can be stretched in marked excess of its maximum extensibility, the representative with the greatest maximum RAD (No. 17 of Table 1) cannot possibly determine the distance constant postulated by the ED

* The portrait of the tubocurarine molecular model is also illustrative of the difference between the bulky build of these molecules with "two-row" interjacences and the slender thread molecules of the simple one-row interjacence polymethylene curares, a difference very aptly emphasized by BOVET in his recent suggestion of the terms "pachycurares" for the former and "leptocurares" for the latter.

Table 1. *Curarizing Potency and Reactive Atom Distance*.*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
						Linear RAD (Å)			Ratio RAD/PR	
Curr. No.	Substance	Type	Curarizing Potency P	Number of atoms of N-to-N row	Rigidity	min.	max.	Range ±%	min.	max.
1	tetramethylammonium[33]	I	0.06	0	none	(4.5)	(∞)	(100)	(75)	(∞)
2	C 4[33]	II	0.0014	4	mod.	6.0	7.0	8	4285	5000
3	C 5[33]	II	0.0027	5	minim.	4.8	8.5	28	1175	3150
4	C 6[33]	II	0.0052	6	,,	5.0	9.9	33	963	1923
5	C 9[33]	II	1.01	9	minim.	4.8	14.0	49	4.8	14
6	C 10[33]	II	1.47	10	,,	4.8	15.3	52	3.3	10
7	C 11[33]	II	0.94	11	,,	4.5	16.7	58	4.8	18
8	C 12[33]	II	0.42	12	,,	4.6	18.0	59	11	43
9	C 18[33]	II	1.12	18	minim.	4.5	26.5	71	4.0	24
10	*d*-tubocurarine	III	1.00	10(10)	mod.	6.0	12.5	35	6.0	12.5
11	isomeric tubocurarines[24]	III	0.025	10(10)	,,	4.7	14.0	50	189	560
12	dimethyl-*d*-tubocurarine[39]	III	7.8	10(10)	,,	5.1	12.5	42	0.65	1.6
13	N-methyloxyacanthine[29]	IV	0.76	9(12)	mod.	5.2	12.5	41	6.8	17
14	pentamethylene-bis-(N-ethyl-8-quinolinium) ether[4]	V	0.75	11	minim.	3.3	11.0	56	4.4	15
15	decamethylene-bis-atropinium[23]	V	2.5	10	,,	5.7	15.2	45	2.3	6
16	pentamethylene-bis-atropinium[22]	V	0.43	5	,,	5.0	8.5	26	11.6	20
17	pentamethylene-bis-(N-methyl-atropinium) ether[23]	V	0.42	21	,,	5.3	27.5	68	11.5	60

* "Curarizing Potencies" (P; column 4) are calculated from Median Rabbit Headdrop Doses (HD_{50}) in reference to HD_{50} of d-tubocurarine (P = HD_{50} of *d*-tubocurarine/HD_{50} of substance in question); all HD_{50} values originate from publications quoted in column 2. In the designations of the onium salts, enumerated in column 2, their anion moieties are omitted for the sake of brevity; it should, however, be mentioned that potency varies considerably with the anion associated (for details consult the references given). — "Number of Atoms" (column 5) is that of the shortest N-to-N row; for substances with double-row interjacence the number of atoms in the second row is added in parenthesis. — Column 9 gives the range between minimum and maximum RAD measured, expressed as per-cent deviation (±) to either side from middle value [± % range = 100 (Max. RAD—Min. RAD)/(Max. RAD—Min. RAD)]. — RAD measurements given for substances No. 10 and 11 are interchangeable, because the spatial arrangement at the asym-

hypothesis. If the ED hypothesis were centered on any RAD smaller than that of the drug having the greatest RAD, the same prerequisite of hyper-extensibility would have to be fulfilled by every equipotent representative having an interjacence which even in the state of maximum extension is shorter than that assumed to represent the distance of fit. In addition, however, the interjacences of all representatives having greater chain length would have to be bent into the distance of fit. The greater the force of repulsion between the RAs, the greater an energy would be needed to force the reactive heads of the curares with excessively long chains into a receptor distance of appropriate fit for equipotent compounds with shorter chains. It should also be considered that, if mutual repulsion determines RAD, necessarily each RAD in a point-symmetrical "three-header" is much smaller than the more optimal RAD in the corresponding one-axially symmetrical "double-header", whereas the potency of the latter in instances is considerably smaller (cf. Flaxedil, page 221).

Thus, the exceptions to two major postulates implied in the above formula of the ED hypothesis, namely, that compounds with equal RAD should be equipotent and compounds of unequal RAD should not, are more frequent than the cases conforming to those postulates. Likewise frequent are the exceptions from a further implication of these two postulates, namely, from the postulate that in each homologous series of bis-onium compounds the potencies of the representatives should gradually or abruptly approach from both sides a potency maximum embodied in the representative having the optimum interjacent chain length. Three examples of such exceptions are the series of bis-triethyl-ammonium methylenes (BTEAn), in which the potency ratio BTEA 13/BTEA 4, i. e., that between the 13-C and the 4-C homolog, is much smaller than in the analogous trimethyl series, and the analogous bis-quinoliniums and bis-strychniniums, in which the potency ratios BQ 10/BQ 5 and BS 5/BS 2 are approximately 1.0[1].

IV.

All the preceding considerations emphasize that the *structure* of the interjacence may be more important than its *length*. Naturally, the interjacence of all bis-quaternary curares extends in three dimensions (compare footnote, page 217), and that makes it comparable with other appendages of reactive radicals, discussed in SAR contexts as "umbrella"

---

metric C atoms of the known isomeric tubocurarines is as yet unknown; arbitrarily the structure depicted in Figure 1 in one of its possible positions was assumed as that of *d*-tubocurarine, and the two extreme values from all other arrangements constructed are given sub No. 11.

structures. Their function is still obscure, but they are known to be indispensable attributes of certain biological agents.

Prominent examples are presumptive blocking agents such as antihistaminics and anticholinergics. In such drugs, the actions of which are often ascribed to spatial competition for a receptor site, the umbrella structure may function by some passive interference due to size and shape of the appendage, for example, an "adumbrating" influence which may hamper the access of substrate or other material to a biologically important site.

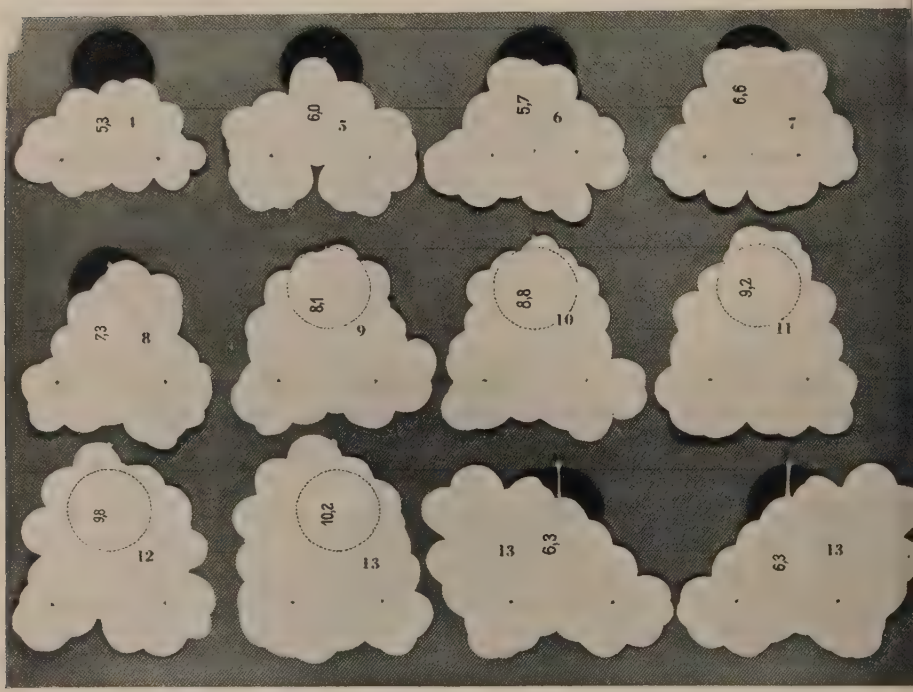


Figure 2. Adumbration of circular area (black) on receptor surface by various homologous bistrimethylammonium polymethylenes. — The white areas are the shadows of the individual homologs, the large numeral designating the number of methylenes (4 to 13) in the N-to-N interjacence. Three different adumbration effects of C 13 are depicted (bottom row) according to three different positions of the interjacent part of the molecule. — The small numeral along central upright line designates projection (in Å) of "umbrella" interjacence from middle of N-to-N connection line. — For further explanation compare text.

Applied to the homologous Cn series, the potentialities of adumbration may be illustrated by the constructions of Figure 2. The pictures represent shadow projections of the molecular models of C 4 to C 13, all the molecules being kept under arbitrary but comparable axial and RAD conditions. The shadows fall upon a plane in which a strategic area is marked by a black circle whose center is at 5 Å vertical distance from the middle of the N-to-N line. As shown in Figure 2, the shadows of the lower homologs are too short to adumbrate the entire strategic

area, those of C 13 and higher homologs too mobile to stay in the same position all the time. Thus, in this example, complete adumbration is indeed limited to the peak-potent homologs C 9 to C 12.

This example is entirely arbitrary. It is not offered as a new explanation of SAR of the curares, but only employed to draw attention to other possibilities of relating structure and activity. The possibilities of umbrella functions go beyond mere passive adumbration. All interjacences, even simple non-substituted polymethylenes, carry groups reactive by short-range, some also by long-range, forces by which they may participate in the pharmacologic reaction, at least by orientating the adumbration. Accordingly, interjacences can come into play by virtue of their own spatial and energetic "fit" rather than as spacers between RAs.

There is indeed ample evidence that curare activity of congeneric bis-oniums which differ only insignificantly in N-to-N distance varies with the spatial and energetic properties of their interjacence.

Examples are: the high potency ratios (PR) between *d*-tubocurarine and its laevorotatory isomer (PR: 30 to 60[24]), between the methyl ether of *d*-tubocurarine and the free-alcohol parent substance (PR: 8[39]), between bis-onium single-row esters of equal chain length which differ only by a permutation of their oxo groups, for instance, between the homobetaine di-ester of propylene glycol and the betaine di-ester of butanediol-1-4, (PR: 300[18, 19]) and between the di-choline ester of terephthalic acid and the homobetaine di-ester of hydroquinone (PR: 9[10, 19]). The example of Bovets and his associates' triethyl-aminoethoxy substituted benzenes[10] is particularly instructive. The 1,2,3-tris-substituted benzene, Flaxedil, is three times as potent as the 1,2-bis-substituted compound (which, in turn, is 13 times as potent as the 1-trimethylaminoethoxy-benzene). In both substances nature and sequence of the chain links between the nitrogens are the same and the number of links varies only between 8 and 9, but the linear N-to-N distance, if determined by the mutual repulsion of the charged heads, is certainly different. It is greater (12 Å), hence closer to the hypothetical optimal RAD, in the less potent bis-onium, in which the nitrogens are supposedly at the opposite ends of the maximally extended chain, than in the tris-onium, in which the nitrogens presumably form the corners of a near-to-equilateral triangle of maximally 10 Å side length. On the other hand, the more potent tris-onium would seem to grant a greater probability of combination of any two of its RAs with the receptor RAs (cf. comparable considerations of *Ing* in application to bis-onium versus mono-onium compounds); the more potent tris-onium also possesses a larger interjacence capable of adumbrating a greater area.

Naturally, all these considerations hold only when possible biochemical differences between the drugs, as in absorption, excretion and metabolic fate, are disregarded.

V.

Two major presuppositions of the ED hypothesis are the structural one that all curarizing agents have a measurable inter-onium distance, and the biological one that they all have the same mechanism of action.

The structural presupposition is invalidated by the numerous potent curarimimetics which are not bis-oniums.

They are either hemi-quaternized diamines, such as 2-(2-diethylamino)amyl-aminobenzoquinone methobromide (I; P = 2.0[13]), 2-piperidylpropylaminobenzo-quinone methobromide (II; P = 2.0[13]), N-propylquinolinium bromide (III; P = 0.06[15]), 5-dimethylaminopentanoylcholine (IV; P = 0.04[18]), C-toxiferine-I (V; P = 39[41]) and C-curarine-I (VI; P = 0.75[41]); or simple mono-oniums, such as tetramethylammonium (P = 0.06 to 2.0[1, 33]); or non-quaternary diamines, such as stilbamidine (P = 0.08[3]) and nicotine (VII[16]); or non-quaternary mono-amines, such as dihydro-beta-erythroidine (VIII; P = 0.1[15]). It cannot be assumed that additional quaternization in the body brings these substances into line with the ED hypothesis; whereas quaternization increases curare activity in some of them, e. g., in the weakly potent diamine IV, it does not markedly change activity in others, and actually diminishes the potency of some, e. g., of certain quinol-iniums[14], of VIII[40] and of nicotine. Thus, to all these curares the formula of the ED hypothesis is not applicable, because they have only one RA.

The biological presupposition is invalidated by the ever-growing amount of evidence that the so-called curarizing drugs are divided into two* separate pharmacologic classes, the class of "curare-like" drugs in the strict sense and the class of depolarizing drugs (Paton[30]).

The former interfere with neuromuscular transmission by desensitizing the end-plate to the depolarizing action of acetylcholine; the latter, however, act by depolarizing the synaptic membrane and lowering the excitability of the adjoining muscle membrane**. These entirely different modes of action can hardly be brought upon a common denominator of identical mechanism and receptor.

However, the very collapse of these premisses could give rise to modified and more clearly outlined ED concepts if the demarcation line between the two structural classes, the bis-oniums and the non-bis-oniums, and that between the two pharmacologic classes, the desensitizers and the depolarizers, could be shown to coincide. The necessary pharmacologic classification of all known blocking agents of neuromuscular transmission is far from being completed.

For most of them the class criteria established mainly by Paton and his associates—such as: degree of antagonism by physostigmine and C 5 and of synergism by ether, ratios of species sensitivities, red muscle/white muscle sensitivity ratio, histamine liberation, isosensitization—have as yet to be determined.

Ironically enough, however, the two agents most thoroughly classified, *d*-tubocurarine and C 10, the major witnesses for the ED hypothesis because of the concomitance of equal and high potency and of equal number of interjacent chain links and optimal RAD, are now ascertained to be the prototypes of the two contrasting pharmacologic classes, the former embodying the truly curarelike, the latter the depolarizing activity.

* Really, four or more classes[30] can be distinguished, but the present discussion can be limited to the two specified here.

** Compare, for instance, the particularly lucid review of Feldberg in this Archiv, **212**, 64, 1950.

VI.

That the "transformation"[25] of pharmacologic potentialities of a drug into pharmacologic effect proceeds by way of a chemical reaction between the drug and some component of the organism—more recently called "receptor"—, is probably the oldest axiom of pharmacology. To identify the receptor for a drug complying with the axiom, and to express the transformation in terms of the particular chemical reaction and the biological sequels in terms of the alteration of the receptor, is the coveted goal of the student of SAR. It is on the approaches to this goal, that he endeavors to predict the receptor from the structural properties of drugs having a certain biological effect in common.

The equidistance concept of curarizing drugs hypothesizes that the transformation, by which they interfere with neuro-muscular transmission, consists in the bonding between a pair of quaternary onium groups in the drug molecule and a pair of co-reactive groups in the receptor molecule, the selectivity of the reaction being determined by congruity of the two intramolecular distances between those pairs of reacting groups. As is shown above, this two-point-landing hypothesis is unsatisfactory because it fails to explain why so many active and selective drugs lack either the stipulated landing gear or its postulated dimensional arrangement and why landing of two equally qualified drugs at supposedly equally qualified mooring places can be ensued by notably different biological sequels. Obviously, the main structural characteristics claimed by the hypothesis are not indispensable components of the equation for curarizing activity; other factors enter the equation and are at least as important determinants as number and distance of the postulated RAs.

Thus, whereas the hypothesis has turned out to be remarkably fruitful in finding new synthetic curares, its heuristic value in contributing to an understanding of the mechanism of transformation is as questionable and as irreconcilable with present knowledge as, for instance, the SAR hypothesis of a dominant role of the presence and number of ethyl groups in hypnotic agents, which may have appeared acceptable in the pre-barbiturate era[17]. The fictitious example of an application of adumbration concepts, given in a preceding section to add a constructive element to the analysis of the equidistance hypothesis, was chosen to emphasize the need for a return from one-dimensional simplifications to a more complex, stereoscopical thinking in line with the old concept of the key-and-lock complementariness between selective agents and their biological substrate. The undeniable SAR significance of what in curarizing drugs with two radicals of particularly pronounced chemical reactivity represents the interjacence, in those

with only one outstanding bonding capacity an umbrella appendix, should certainly facilitate the turn from premature streamlining to a fuller appreciation of the tridimensional potentialities of the "Gestalt" of the curarizing drugs.

Summary.

1. In a selection of representatives of the four major types of bis-quaternary ammonium compounds selectively interfering with neuromuscular transmission and of some congeners lacking such selectivity, the linear intramolecular distance between the two reactive onium nitrogens was measured in molecular models.

2. The reactive atom distance was found to be variable over a wide range in each individual compound, multiple rotation about atomic bonds along the N-to-N interjacence allowing variation of the spatial arrangement of the molecule.

3. From no aspect, including the assumption that the maximum N-to-N distance is prevalent because of the mutual repulsion of the cationic heads, was it possible to find any correlation between selective activity and the reactive atom distance.

4. These observations and a discussion of other pertinent data were employed to evaluate the hypothesis that the N-to-N interjacence of bis-onium compounds serves as a rigid spacer of the cationic heads and that curarizing activity is explained by the reaction of optimally spaced onium groups of the drug with equidistant co-reactive groups of a biological receptor substance (equidistance hypothesis of curarizing activity). It is concluded that the equidistance hypothesis in its present form cannot be reconciled with the facts known about any of the various types of drug interference with neuromuscular transmission and the prominent representatives of these activities.

5. In order to demonstrate that with no lesser ease diametrically opposite concepts can be formed, in which the emphasis is shifted from the mere spacer role of the interjacence to the details of the spatial arrangement of the interjacence, an example is presented of the application of an "adumbration" hypothesis of curarizing activity to the series of bis-onium polymethylenes; in contrast to the equidistance hypothesis, this hypothesis applies to non-bis-onium compounds as well as to bis-oniums.

6. The adumbration hypothesis, though by no means offered as an explanation of curarizing activity, is found useful to accentuate the necessity of a return to considerations of the totality of tectonic and bonding potentialities which determine the spatial and energetic fit between drug and receptor.

Zusammenfassung.

1. Für ausgewählte Vertreter der vier Hauptgruppen bis-quaternärer Ammoniumverbindungen, die selektiv die neuromuskuläre Reizübertragung beeinträchtigen, und für einige verwandte Substanzen, denen diese Wirkung fehlt, wurde der geradlinige Abstand zwischen den beiden reaktiven Onium-Stickstoffatomen an Molekülmodellen gemessen.

2. Der Abstand der reaktiven Atome wurde in jeder Verbindung in einem weiten Bereich schwankend gefunden, da vielfältige Rotation um die Atombrücken entlang dem Zwischenstück zwischen den beiden Stickstoffatomen ständige Veränderungen der räumlichen Anordnung des Moleküls erlaubt.

3. Unter keinem Gesichtspunkt, auch nicht unter der Annahme, daß wegen der wechselseitigen Abstoßung der kationischen Endradikale der *maximale* N-N-Abstand der vorherrschende ist, konnte eine feste Beziehung zwischen selektiver Wirksamkeit und dem Abstand der reaktiven Atome gefunden werden.

4. Diese Beobachtungen und eine Erörterung anderer einschlägiger Erfahrungen wurden zu einer Beurteilung der Hypothese verwendet, daß das N-N-Zwischenstück der Bis-onium-Verbindungen als starre Verspannung zwischen den kationischen Endgruppen dient und daß Curarewirksamkeit sich aus der Reaktion optimal verspannter Oniumgruppen des Pharmakons mit im selben Abstand angebrachten coreaktiven Gruppen einer biologischen Receptorsubstanz erklärt (Äquidistanzhypothese der Curarewirksamkeit). Es wird der Schluß gezogen, daß die Äquidistanzhypothese in ihrer gegenwärtigen Form mit den heutigen Kenntnissen über die verschiedenen Arten der Beeinträchtigung der neuromuskulären Reizübertragung und über die Spitzenvertreter für diese Wirkungsarten nicht in Einklang ist.

5. Um zu zeigen, daß man sich nicht weniger schlüssige Vorstellungen ganz entgegengesetzter Art bilden kann, in denen der Schwerpunkt von der bloßen Verspannerrolle des Zwischenstücks auf die Einzelheiten von dessen Raumerfüllung verlegt ist, wird ein Beispiel der Anwendung einer „Beschattungs"-Hypothese der Curarewirksamkeit auf die Reihe der Bis-onium-polymethylene erörtert.

6. Die Beschattungshypothese, die im Gegensatz zur Äquidistanzhypothese auch auf Nicht-Bis-onium-Verbindungen angewandt werden kann, wird zwar keineswegs als eine *Erklärung* der Curarewirksamkeit, aber doch als nützlich betrachtet, um die Notwendigkeit einer Rückkehr zur Berücksichtigung der *Gesamtheit* der molekularen Bau- und der dadurch gegebenen Bindungsmöglichkeiten zu betonen, die den räumlichen Sitz und energetischen Effekt des Pharmakons am „Receptor" bestimmen.

Bibliography.

[1] Barlow, R. B., and H. R. Ing: Brit. J. Pharmacol. **3**, 298 (1948). — [2] Barlow, R. B., and H. R. Ing: Nature (Lond.) **161**, 718 (1948). — [3] Bergman, F., I. B. Wilson and D. Nachmansohn: Biochim. et Biophys. Acta **6**, 217 (1950). — [4] Bovet, D., S. Courvoisier, R. Ducrot and J. Horclois: C. r. Acad. Sci. Paris **223**, 597 (1946). — [5] Bovet, D., S. Courvoisier, R. Ducrot and J. Horclois: C. r. Acad. Sci. Paris **224**, 1733 (1947). — [6] Bovet, D., F. Depierre and Y. de Lestrange: C. r. Acad. Sci. Paris **225**, 74 (1947). — [7] Bovet, D., F. Depierre, S. Courvoisier and Y. de Lestrange: Arch. internat. Pharmacodynamie **80**, 172 (1950). — [8] Bovet, D., and F. Bovet-Nitti: Experientia **4**, 325 (1948). — [9] Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino and R. Fusco: Helv. Physiol. Acta **6**, C 52 (1948). — [10] Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino and V. G. Longo: Rend. Ist. Sup. di Sanita **12**, 81 (1949). — [11] Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino, V. G. Longo and M. Marotta: Rend. Ist. Sup. di Sanita **12**, 106 (1949). — [12] Breinl, F., and F. Haurowitz: Z. physiol. Chem. **192**, 45 (1930). — [13] Cavallito, C. J., A. E. Soria and J. O. Hoppe: J. Amer. chem. Soc. **72**, 2261 (1950). — [14] Chase, H. F., and A. J. Lehman: J. of Pharmacol. **75**, 265 (1942). — [15] Chase, H. F., A. J. Lehman and E. E. Rickards: J. of Pharmacol. **82**, 266 (1944). — [16] Elliott, T. R.: J. of Physiol. **35**, 367 (1907). — [17] Fränkel, S.: Die Arzneimittelsynthese, 4th ed., Berlin 1919, p. 472. — [18] Fusco, R., G. Palazzo, S. Chiavarelli and D. Bovet: Gazz. chim. ital. **79**, 129 (1949). — [19] Fusco, R., G. Palazzo, S. Chiavarelli and D. Bovet: Gazz. chim. ital. **79**, 836 (1949). — [20] Haurowitz, F., and F. Breinl: Z. physiol. Chem. **205**, 259 (1933). — Haurowitz, F., and F. Kraus: Z. physiol. Chem. **239**, 78 (1936). — Haurowitz, F.: Bull. VI[e] Congr. de Chimie biologique, Lyon, 1937. — [21] Keasling, H. H., and F. W. Schueler: J. Amer. pharmaceut. Assoc. **39**, 87 (1950). — [22] Kimura, K. K., and K. R. Unna: J. of Pharmacol. **98**, 286 (1950). — [23] Kimura, K. K., K. Unna and C. C. Pfeiffer: J. of Pharmacol. **95**, 149 (1948). — [24] King, H.: J. Chem. Soc. Lond. **1947**, 936. — [25] v. Kries, J., in: W. Nagel, Handbuch d. Physiol. d. Menschen, Vol. 3. Braunschweig 1905. — [26] Loewe, S., and R. Adams: Federation Proc. **6**, 352 (1947). — [27] Loewe, S.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 175 (1950). — [28] Loewe, S., and S. C. Harvey: J. of Pharmacol. **101**, 23 (1951). — [29] Marsh, D. F., D. A. Herring and C. K. Sleeth: J. of Pharmacol. **95**, 100 (1948). — [30] Paton, W. D. M.: J. Pharm. & Pharmacol. **1**, 273 (1949). — [31] Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Nature (Lond.) **161**, 718 (1948). — [32] Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Nature (Lond.) **162**, 810 (1948). — [33] Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Brit. J. Pharmacol. **4**, 381 (1949). — [34] Pauling, J.: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2643 (1940). — Pauling, L., and D. H. Campbell: Science (Lancaster. Pa.) **95**, 440 (1942). — Pauling, L., D. H. Campbell and S. D. Pressman: Physiol, Rev. **23**, 203 (1943). — [35] Pfeiffer, C. C.: Science (Lancaster, Pa.) **107**, 94 (1948). — [36] Potter, V. R., and K. P. DuBois: J. gen. Physiol. **26**, 391 (1943). — [37] Schueler, F. W.: Science (Lancaster, Pa.) **103**, 221 (1946). — [38] Seed, J. C., and E. A. McKay: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **70**, 724 (1949). — [39] Swanson, E. E., G. Henderson and K. K. Chen: J. Labor. a. clin. Med. **34**, 516 (1949). — [40] Unna, K., M. Kniazuk and J. G. Greslin: J. of Pharmacol. **80**, 39 (1944). — [41] Waser, P.: Helv. physiol. pharm. Acta **8**, 342 (1950). — [42] Welsh, J. H.: Amer. Scientist **38**, 239 (1950). — [43] Welsh, J. H., and R. Taub: Science (Lancaster, Pa.) **112**, 467 (1950). — [44] Willstaetter, R., and W. Heubner: Ber. dtsch. chem. Ges. **40**, 3869 (1907). — [45] Woods, D.: Brit. J. exper. Path. **21**, 74 (1940).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 227—241 (1952).

Aus den Pharmakologischen Instituten der Universitäten Leipzig und Göttingen
(Direktor: Professor Dr. L. Lendle).

Wirkung von Insecticiden auf ein isoliertes Ganglien-Muskel-Präparat von Dytiscus marginalis (Gelbrandkäfer).

Von
H. Fritsch und H. Krupp.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. August 1951.)

Über die Wirkungsweise moderner Insecticide besteht keine einheitliche Auffassung. Im allgemeinen betrachtet man sie als „Nervengifte", nicht so sehr wegen ihrer problematischen Fähigkeit der „Nervenwanderung" von der Aufnahmestelle in der Chitinhülle aus, als weil sie mit Krämpfen und Lähmung die Schädlinge abtöten. Der spezifische Angriffspunkt am Nervensystem wird aber verschieden beurteilt.

Velbinger[1] und Welsh und Gordon[2] vertraten die Auffassung, daß sie übermäßig große afferente Impulse von peripheren Sinnesorganen oder Nervenstämmen auslösen und damit toxisch wirken. Auch Domenjoz[3] hält noch an einem hypothetischen peripheren Ganglienzell-Apparat als Angriffsort fest. Nach neuen Erfahrungen über eine toxische Wirkungsweise insecticider Stoffe am Zentralnervensystem von Wirbeltieren (Hoffmann und Lendle[4], Schwarz[5], Schneider und Lendle[6], Herken[7], McNamara[8] u. a.) und nach Vergiftungen am Menschen Velbinger[1] u. [9]) dürfte den Insecticiden wohl vorwiegend eine zentralnervöse Wirkung zuzuschreiben sein. Es ist aber andererseits bekannt, daß sie zum Teil auch auf die glatte Muskulatur von Würmern (selbst nach Ganglienentfernung) wirksam sind (Schneider und Lendle[6]).

Fritsch[10] konnte bei genauen Einzelbeobachtungen über die Art der Krampferscheinungen und der motorischen Störungen im Anfangsstadium der Vergiftung mit Dichlor-diphenyl-trichlormethylmethan (DDT), 1, 2, 3, 4, 5, 6-Hexachlorcyclohexan (HCC) und Diäthyl-paranitrophenol-thiophosphat (E 605) an verschiedenen Insektenarten die Vermutung begründen, daß DDT nicht nur wie E 605 und HCC eine Wirkung auf die Bauchmarkganglien, sondern auch auf den peripheren Muskelapparat besitzt. Es gelang ihm auch am Gelbrandkäfer nach Freipräparieren und Abtrennen der Bauch-Ganglienkette am vergifteten Tier nachzuweisen, daß die DDT-Wirkung erhalten bleibt. Ferner konnte er nach Resektion der Ganglienkette am reinen Muskelpräparat mit aufgetragenen DDT-Lösungen direkte Kontraktionen auslösen. Schließlich stellte er ein isoliertes Bauchmark-Ganglienpräparat in Verbindung mit

der Abdominalmuskulatur her, an dem sich die Wirkungsweise von Insektiziden quantitativ nachweisen läßt.

Diese ersten Befunde am isolierten Ganglienpräparat haben wir inzwischen bestätigt und erweitert um Erfahrungen über antagonistische Wirkungen gegenüber den Insecticiden. Dabei ergaben sich auch Fragen über die chemische Übertragung im Nervensystem der Insekten. Erste Angaben darüber werden in der Dissertationsarbeit von Krupp[11] gemacht. An dieser Stelle sind auch die Literaturangaben über die Anatomie des Nervensystems bei Insekten, insbesondere beim Gelbrandkäfer, zusammengestellt.

I. Herstellung eines Ganglienzell-Muskelpräparates des Gelbrandkäfers.

Für die Prüfung ganglionärer Erregungen auf Muskelkontraktionen eignen sich nach der Anordnung die letzten Ganglienpaare der Bauchkette, die gemeinsam mit dem gesamten Abdomen abgetrennt werden können und direkt pharmakologische Wirkungen auf isolierte Ganglien zu untersuchen gestatten. Nach Erfahrungen von Fritsch[10] läßt sich der Gelbrandkäfer besonders leicht verwenden, weil seine anatomischen Bedingungen günstig sind und die Fixierung der Muskulatur des Abdomens in dem festen Chitinpanzer keine Schwierigkeiten bereitet. Nach weiteren Erfahrungen eignen sich Küchenschaben (Blatta orientalis L.) und Maikäfer (Melolontha vulgaris L.) nicht.

Für die Präparation wurde als optisches Hilfsmittel ein binokulares Mikroskop verwendet. Ein Skalpell wird zwischen Prothorax und Mesothorax eingeführt und durch einen Schnitt das erste Brustsegment samt Kopf abgetrennt. Anschließend werden die Deckflügel gespreizt und der Rumpf auf einer Korkunterlage mit Stecknadeln fixiert. Die hinteren Flügel werden an ihrer Wurzel abgeschnitten. Eröffnung des Abdomens mit der Schere durch Ausschnitt eines Fensters aus der weichen dorsalen Abdominaldecke, welches nach cranial bis zum Rand des 3. Thorakalsegmentes und nach caudal bis zur Gelenkhaut zwischen 3. und 4. Abdominalsegment reicht. Die letzten 3 Segmente des Abdomens bleiben erhalten. Jetzt wird die Decke des Meta- und Mesothorax durch einen Längsschnitt an jeder Seite, und nach Lösung der anhaftenden Flugmuskulatur durch einen Querschnitt am vorderen Rande des Mesothorax entfernt. Die Organe des Thorax und des Abdomens bis zum 3. letzten Segment liegen damit bloß. Mit der Pinzette faßt man den Vorderdarm in der Nähe seines vorderen Stumpfes unmittelbar hinter der Schnittstelle am Mesothorax und hebt ihn vorsichtig hoch, so daß er sich ohne Verletzung des darunter liegenden Bauchmarkes soweit wie möglich caudal abtrennen und entfernen läßt. Nun liegt die zur Abdominalmuskulatur gehörige Ganglienkette frei in der aus Muskeln gebildeten mittleren Rinne des Thorax.

Das erste Abdominalganglion ist dem Ganglion des Metathorax so sehr genähert, daß von den Commissuren nichts mehr zu sehen ist, die die Ganglien untereinander verbinden. Das erste Abdominalganglion liegt also im Metathorax. Das zweite Abdominalganglion bildet mit den folgenden Ganglien eine kurze Kette über der mittleren Rinne, welche die beiden Extensores posteriores trochanteris voneinander trennt. Die ersten 4 Ganglien (also Ganglion 2—5) dieser Kette sind untereinander durch sehr kurze Commissuren verknüpft, das 4. (Ganglion 5) ist dagegen mit dem

letzten Ganglion (Ganglion 6) schon eine weitgehende Verschmelzung eingegangen, so daß von den Commissuren nichts mehr zu entdecken ist. Sämtliche Abdominalnerven, d. h. auch die Nerven des ersten Abdominalganglions, strahlen nach allen Seiten über die Dorsalseite der Extensores trochanteris metathoracis aus. Je näher die Ganglien dem Innervationsgebiet der ihnen entspringenden Nerven liegen, desto früher spalten sich diese in mehrere Äste. Je mehr sich aber das Innervationsgebiet von dem Nervenzentrum entfernt, desto länger wird der unverzweigte Nervenstrang.

Durch zwei der Ganglienkette parallellaufende Schnitte werden die abzweigenden Nerven bis auf die der beiden letzten Ganglienpaare durchschnitten und die Ganglienkette nach cranial in Höhe des zweiten Abdominalsegmentes abgetrennt.

Es bleiben also 5 Ganglienpaare am Präparat, von denen die ersten beiden zum Anfassen verwendet werden. Man ergreift mit einer feinen Pinzette ihren Stumpf und hebt die Ganglienkette etwas hoch, löst sie vorsichtig durch langsamen Zug nach caudal von ihrer Unterlage ab und legt sie auf das Abdomen, so daß bei der vollen Abtrennung des Abdomens vom Thorax weder sie noch die erhaltenen peripheren Nerven verletzt werden.

Nach Durchschneidung der Gelenkhaut zwischen Metathorax und erstem Abdominalsegment sind Thorax und Abdomen nur noch durch die beiden Gelenkschlösser verbunden, die mit einem Scherenschlag durchtrennt werden. Mittels zweier Stecknadeln wird das Präparat auf einer Korkplatte fixiert, die mit einem Gelenkhebel an einem Stativ angebracht ist. In ein 0,5 cm^3 Ringer-Lösung fassendes Glasschälchen, welches in geringem Abstand von dem Präparat in die Korkplatte eingelassen ist, hängt die Ganglienkette hinein. Die Nerven biegen über den glatten Glasrand und überbrücken eine kurze freie Strecke zwischen diesem und dem Präparat. Gelegentlich wird auf diesen Nervenabschnitt, ebenso wie auf das freiliegende Eingeweide etwas Insekten-Ringer getropft, um die Austrocknung zu verhindern. Insekten-Ringer hat nach Angaben von Wigglesworth[12] folgende Zusammensetzung: NaCl 60,0; KCl 1,3; $CaCl_2$ 1,3; $NaHCO_3$ 0,7 auf 5 l Aqua dest. An der hinteren Leibesspitze wird ein feiner Serrefine befestigt. Mit einem leichten Schreibhebel werden die Bewegungen des Abdomens auf ein Kymographion übertragen.

Die zu prüfenden Substanzen bringt man in Ringer gelöst oder suspendiert in das Glasschälchen. Die vorher darin befindliche Flüssigkeit wird durch kleine Zellstoffkügelchen abgesogen. Es empfiehlt sich, mit der Registrierung der Spontanschreibung 10—15 min zu warten, da es scheint, daß das Präparat nach der Herstellung erst eine gewisse Tonuslage erreichen muß, ehe eine Spontanschreibung registriert werden kann, die durch eine gewisse Regelmäßigkeit ausgezeichnet ist. Belüftung der Ringer-Lösung ist nicht notwendig. Das Präparat ist über 6 Std verwendungsfähig.

Zum besseren Verständnis der Erklärungen sei auf Abbildungen in E. Korschelt, Bearbeitung einheimischer Tiere, 1924, verwiesen.

II. Anordnung der Versuchsbedingungen.

Nachdem in Vorversuchen ein Urteil über die normalen Lebensbedingungen des Präparates gewonnen worden war, konnten die verschiedenen Insecticide vergleichend geprüft werden, indem steigende Konzentrationen in das Glasnäpfchen gefüllt wurden. Die Konzentrationssteigerung erfolgte erst, wenn innerhalb von 5 min keine Reaktion erkennbar war. Die Ermittlung der wirksamen Grenzkonzentration wurde durch weiteres Einengen in zahlreichen Versuchen ausgeführt.

Die Verdünnungen der zu prüfenden Insecticide wurden aus einer 1%igen Stammlösung in absolutem Alkohol unter Verwendung von Insekten-Ringer mit 0,25% Zusatz von Adhägon als Emulgator hergestellt. Adhägon ist ein indifferentes oberflächenaktives Eiweißabbau-Produkt (Heyden-Dresden). Die feindispersen Suspensionen sind aber noch unbeständig und müssen zu jedem Versuch neu hergestellt werden. Die Anwesenheit von Alkohol in den zu prüfenden Konzentrationen machte es notwendig, in Vorversuchen den Einfluß des Alkohols festzustellen. Geprüft wurden Alkohollösungen von 0,5, 1, 2 und 3%. Die 0,5%ige Alkohollösung zeigte keine Wirkung, während 1%ige und höhere Alkoholkonzentrationen eine Erhöhung von Tonus, Frequenz und eine Vergrößerung der Amplitude zur Folge hatten. Diese Wirkung war durch Ringer-Spülung gut auswaschbar. Am Ganglion sind also excitierende Alkoholwirkungen nachweisbar. Die Versuche führten nicht in den Bereich der Alkohollähmung. Anscheinend ist das Ganglion gegen Alkohol weniger empfindlich als zentralnervöse Elemente.

Das Ganglienpräparat konnte im Gang der pharmakologischen Analyse auch zu einer vergleichenden Untersuchung über eventuelle periphere Angriffspunkte am Muskel selbst benutzt werden. Wenn durch die Insecticide Erregung oder Lähmung am Ganglion erzeugt worden war, konnte durch Resektion des Nervenstranges vom Ganglion zum Abdomen der Einfluß des Ganglions völlig ausgeschaltet werden. Unter diesen Umständen trat unter Tonussenkung eine völlige Ruhigstellung des Präparates ein. Nunmehr konnten die gleichen Gifte (wiederum in steigenden Konzentrationen) an der Muskulatur des Abdomens geprüft werden.

Die spontane Rhythmik der einzelnen Präparate kann nach Frequenz und Amplitude der Kontraktionen wechseln. Man kann sie als physiologische Atmungsexkursionen betrachten oder als rhythmische Impulse, die normalerweise von der Ganglienkette zu den segmentalen Muskeln gelangen.

Nach von Buddenbrock[13] ist das Zentralnervensystem der niederen Metazoen in hohem Maße abhängig von den Reizen, die ihm von den peripheren Sinnesorganen zufließen, während bei den höherentwickelten Metazoen das ZNS immer unabhängiger von der Peripherie wird. Adrian[14] konnte an Dytiscus marginalis nach Abtrennung sämtlicher afferenter Nerven noch vom Zentralnervensystem ausgehende rhythmische Impulse nachweisen.

III. Versuche am isolierten Ganglienpräparat.

A. Eigenwirkung der einzelnen Insecticide.

DDT wurde in Konzentrationen von 10^{-8} — 5×10^{-5} in 10 Versuchen geprüft. Im Bereich 10^{-8} — 5×10^{-7} war keine Wirkung festzustellen. Ab 10^{-6} — 2×10^{-5} traten leichte Tonuserhöhungen und Frequenzvermehrungen ein. Mit 5×10^{-5} erfolgte in 2—3 min eine deutliche Erregung (Kurvenbild Nr. 1). Sobald die Erregung voll ausgebildet ist, kann sie durch erneute Gaben von DDT nicht mehr verstärkt werden. Der Höhepunkt der Erregung ist nach ungefähr 30 min erreicht. Es kommt zu keiner Lähmung.

Im Endzustand nehmen die Amplituden langsam wieder ab, was vielleicht auf einen Erschöpfungszustand der Ganglienkette und Muskulatur zurückzuführen ist.

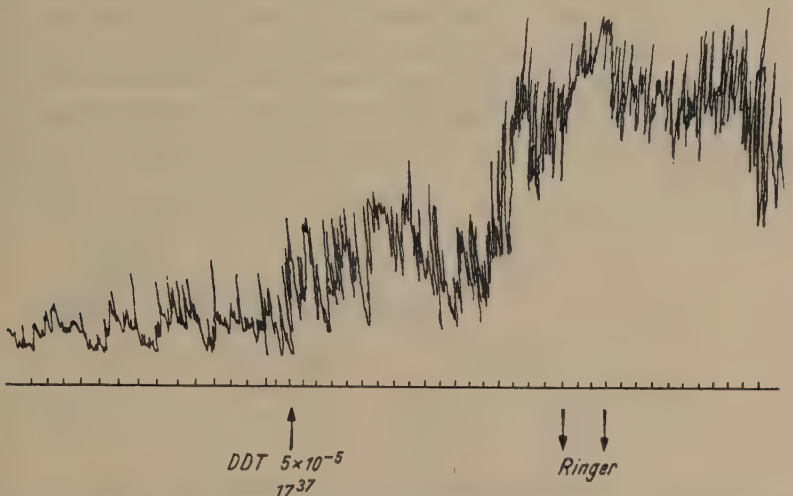


Abb. 1. Wirkung von DDT 5×10^{-5} auf die isolierte Ganglienkette des Gelbrandkäfers. (Zeitmarkierungen in 20 sec.)

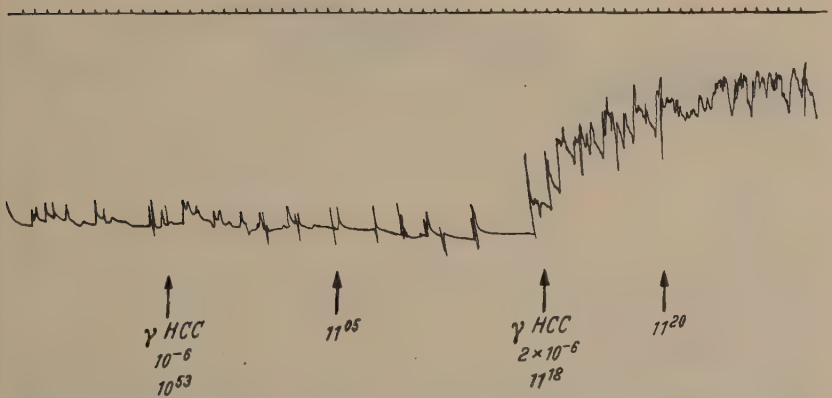


Abb. 2. Wirkung von γ-HCC 10^{-6} und 2×10^{-6} an der Ganglienkette. (Zeitmarkierungen in 20 sec.)

Es scheint, daß DDT am Anfang der Vergiftung noch begrenzt auswaschbar ist, was sich in einem Abfall des Tonus und in einer Verkleinerung der Amplitude zeigt. Die Erhöhung der Frequenz bleibt bestehen. Spätere mehrfache RINGER-Spülungen sind ohne Einfluß auf den Wirkungsanstieg.

γ-HCC zeigt in 5 Versuchen im Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-6} keinen deutlichen Einfluß auf die Spontanmotorik. Erst 2×10^{-6}

führt zu einer Frequenzerhöhung, einer Vergrößerung der Amplitude und einer Tonuserhöhung (siehe Kurve 2).

Im Konzentrationsbereich von 5×10^{-6} bis 5×10^{-5} war gegenüber 2×10^{-6} keine deutliche Verstärkung des Vergiftungserfolges zu verzeichnen. Bei 10^{-4} trat eine deutliche Abnahme des Tonus und eine Verkleinerung der Amplitude auf. Eine volle Lähmung trat nicht auf.

E 605 zeigt schon in Konzentrationen von 10^{-8} eine Veränderung des Kurvenbildes (4 Versuche). Es tritt eine Steigerung des Tonus auf,

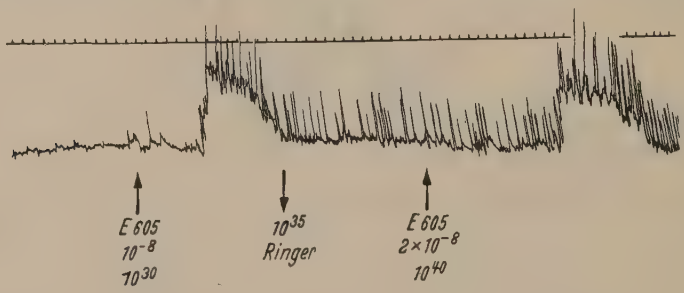


Abb. 3. E 605-Wirkung an der Ganglienkette. (Zeitmarkierungen in 20 sec.)

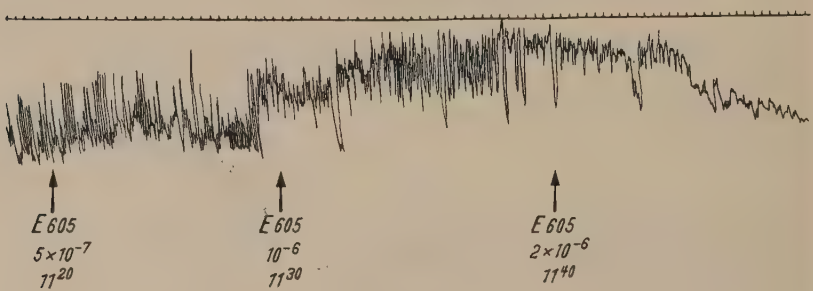


Abb. 4. Wirkung von E 605 an der Ganglienkette. (Zeitmarkierungen in 20 sec.)

verbunden mit einer Frequenzerhöhung und einer Vergrößerung der Amplitude. Der Tonus kehrt nach ungefähr 3 min zur Ausgangslage zurück, während die Frequenzerhöhung und die Vergrößerung der Amplitude erhalten bleibt (siehe Kurve 3 u. 4). Bei 10^{-6} bleibt die anfängliche erhöhte Tonuslage erhalten. Ab 2×10^{-6} war eine deutliche Abnahme der Amplitude und des Tonus zu verzeichnen. Ab Konzentrationen von 10^{-5} war das Vergiftungsbild gekennzeichnet durch wellenartig verlaufende Tonusschwankungen, die nur ab und zu durch kleinschlägige, frequente Ausschläge unterbrochen wurden. E 605 in einer Konzentration von 10^{-4} führt zu einer vollkommenen Lähmung. Auch die Wirkungen von E 605 sind in keinem Stadium auswaschbar.

B. Beeinflussung des Vergiftungsbildes durch die Temperatur.

HAEFLIGER[15] konnte für die Honigbiene zeigen, daß Beläge von DDT bei 20° giftig, bei 28° deutlich weniger aktiv und bei 38° gänzlich unwirksam waren. In Analogie zu diesem Befund versuchten wir die Vergiftungsbilder von DDT, γ-HCC und E 605 durch Spülungen mit RINGER-Lösungen von 38° zu beeinflussen. Es kam danach zu einer Abnahme der Amplitude und einer Tonussteigerung (siehe Kurve 5). Die Beeinflussung des Vergiftungsbildes durch die Temperatur ist nur möglich, wenn der Wirkungsanstieg in der Kurve noch nicht sein Maximum erreicht hat. Bei anschließender Abkühlung tritt sofort das alte Vergiftungs-

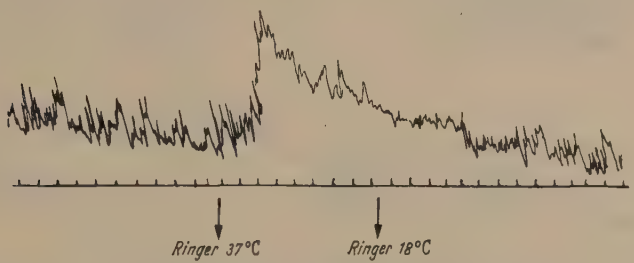


Abb. 5. Einfluß von Kalt- und Warmspülungen mit Insektenringer am Ganglion des Gelbrandkäfers nach DDT 5×10^{-5}. (Zeitmarkierungen in 20 sec.)

bild wieder hervor. Dieser Befund konnte für alle 3 Insecticide in je 2 Versuchen bestätigt werden.

Eine Deutung können wir diesen Befunden noch nicht geben. Es mag nur darauf hingewiesen werden, daß Dekapitierung und Abkühlung erfahrungsgemäß auch am Frosch die Krampfneigung für Strychnin erhöht.

C. Versuche am Muskel nach Ganglienausschaltung.

Nachdem die Insecticide von der Ganglienkette aus eine deutliche Erregung gezeigt hatten, wurde die Ganglienkette reseziert, wonach dann sofort ein Tonusabfall und vollkommene Lähmung eintraten (siehe Kurve 6).

Zur Untersuchung peripherer Wirkungen wurden die Insecticide nun mit einer Spritze in den Bauchraum gebracht. Auch hier wurden die Stoffe im Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 5×10^{-5} geprüft. γ-HCC und E 605 zeigten keinen Einfluß, während durch DDT ab Konzentrationen von 2×10^{-6} rhythmische Kontraktionen hervorgerufen werden konnten, die sofort nach den Injektionen im vollen Umfange auftraten. Der Befund konnte in 10 Versuchen bestätigt werden. Eine Latenzzeit, wie bei zentraler Applikation am Ganglion, wurde nicht beobachtet. Die Wirkung war nicht mehr auswaschbar.

Diese Befunde bestätigen die Beobachtung von Fritsch[10], daß DDT zentral und peripher, γ-HCC und E 605 dagegen nur zentral wirken.

D. Prüfung antagonistischer Wirkungen.

Die Untersuchungen antagonistischer Wirkungen wurden gegenüber DDT, γ-HCC und E 605 mit Nicotin, Atropin und den sogenannten Ganglienblockern (Pendiomid und Buscopan) vorgenommen. Auch ein

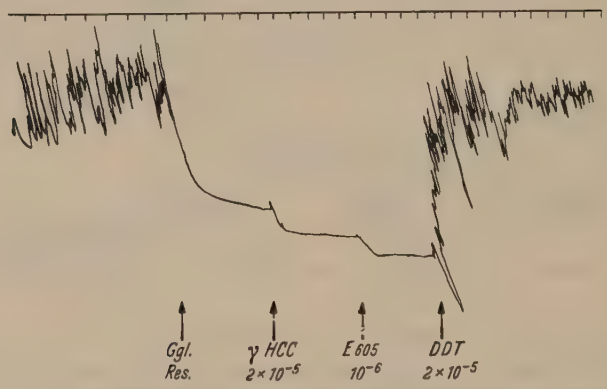


Abb. 6. Ganglionresektion und periphere Wirkung von γ-HCC, E 605 und DDT an der Abdominalmuskulatur. (Zeitmarkierungen in 20 sec.)

peripher nervenlähmendes Gift (Novocain) und ein Narkoticum (Urethan) wurden zum Teil in diese Versuche eingezogen.

1. Nicotin.

Nicotin ist selbst ein ganglionär erregendes und lähmendes Gift, dessen pharmakologisches Verhalten an den Ganglien des vegetativen Nervensystems seit Schmiedeberg[23] und Langley[16] vielfach studiert ist. An unserem Präparat zeigte Nicotin, welches übrigens auch ein bewährtes Insecticid ist, an der Ganglienkette Wirkungen in Konzentrationen ab 3×10^{-6}. Es konnte durch Nicotin ein erregtes Ganglion gelähmt werden, so daß sein Wirkungsbild im Verhalten einer ganglionären Blockierung entsprach. Es erfolgte ein starker Tonusanstieg, der meist schnell in eine Lähmung mit Tonusverlust überging. Bei Ringer-Spülung verschwand die Lähmung wieder und Erregungserscheinungen traten wieder auf.

Die ganglionär erregenden Wirkungen von DDT 5×10^{-5} und γ-HCC 2×10^{-6} konnten durch Nicotin 10^{-3} aufgehoben werden (je 4 Versuche).

Bei weiterer Prüfung war von Interesse, ob Nicotin auch die periphere DDT-Wirkung am Skelettmuskel antagonistisch aufheben kann. Diese Frage war von besonderer Bedeutung, weil vielfach die Ansicht vertreten

wird, daß die DDT-Erregung über sogenannte „periphere Ganglien" zustande kommt. Wenn dies der Fall ist, dann konnte erwartet werden, daß Nicotin auch peripher antagonistisch wirkt. Kritisch zu beachten bliebe jedoch, daß Nicotin die Nervenendplatten lähmen kann oder in hohen Konzentrationen Kontraktur der Muskulatur bedingt. Es konnte gezeigt werden, daß eine Nicotindosis von 10^{-3}, die am Ganglion eine durch DDT 5×10^{-5} erzeugte Erregung fast vollständig aufhob, bei peripherer Applikation von DDT 5×10^{-5} (in 6 Versuchen) wirkungslos blieb (s. Kurve 7 u. 8).

Auf Grund dieses Befundes liegt es nahe, an einen muskulären Angriffspunkt von DDT zu denken.

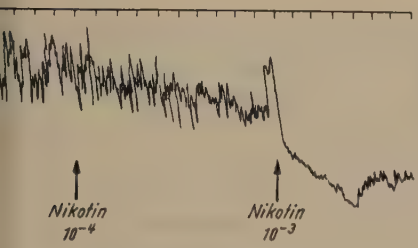


Abb. 7.

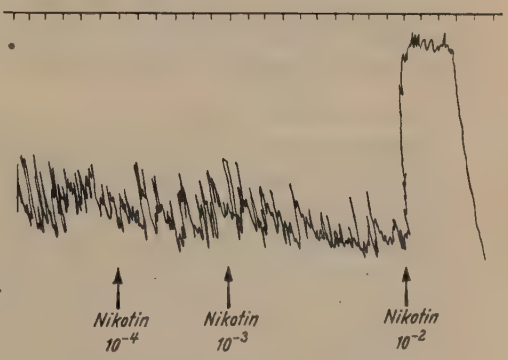


Abb. 8.

Abb. 7. Wirkung von Nicotin nach DDT am isolierten Ganglion. (Zeitmarkierungen in 20 sec.)
Abb. 8. Wirkung von Nicotin nach DDT an der Abdominalmuskulatur. (Zeitmarkierungen in 20 sec.)

Nicotin in einer Konzentration von 10^{-2} wirkte selbst in der Peripherie muskulär lähmend nach vorausgehender Kontraktur.

2. Atropin.

Dem Atropin kommt nach neuen experimentellen Erfahrungen in genügend hohen Konzentrationen eine antagonistische Wirkung gegenüber Acetylcholin an vegetativen Ganglien zu (Feldberg[17]). Ferner war Atropin nicht ohne Interesse, weil ihm am Warmblüter gegenüber einigen esterasehemmenden Stoffen, die auch insecticid wirken können, antagonistische Wirkung zukommt (Phosphorsäureester, DFP usw.).

Unsere Versuche ergaben gegenüber E 605, welches auch in die Gruppe der Phosphorsäureester gehört, bis zu Konzentrationen von 10^{-3} keine antagonistische Wirkung. Bei unvorbehandelten Präparaten zeigte Atropin erst bei 10^{-3} mäßige, reversibel lähmende Wirkungen, die aber nicht zur Aufhebung der Automatie führten (3 Versuche).

3. Ganglienblockierende Substanzen.

Mit dieser Bezeichnung werden eine Anzahl neuer Stoffe zusammengefaßt, die auf die Ganglien des sympathischen und parasympathischen

Systems spezifisch lähmende Wirkung besitzen sollen. Wir verwandten das Pendiomid (Ciba) und Buscopan (Boehringer). Es gelang uns nicht durch diese beiden Stoffe bis Konzentrationen von 10^{-3} eine Aufhebung der spontanen Automatie oder von Erregungen, hervorgerufen durch DDT 5×10^{-5}, γ-HCC 5×10^{-5} und E 605 5×10^{-8}, aufzuheben (5 Versuche). Auch am peripheren Muskelpräparat haben auf eine durch DDT 5×10^{-5} erzeugte Erregung beide Stoffe keine Wirkung (5 Versuche). Dies ist besonders bei Buscopan beachtenswert, von dem bekannt ist, daß es nicht nur ganglionär lähmend, sondern auch wie Curarin auf die Nervenendplatten lähmend wirkt.

Die negativen Ergebnisse erscheinen uns von besonderem Interesse, weil sich hier also ein typischer Unterschied zwischen vegetativen Ganglien und motorischen Ganglien zeigt.

4. Novocain und Urethan.

Beide Stoffe wirken sowohl am normalen mit Spontanautomatie wie am künstlich erregten Ganglion (3 Versuche). Partielle lähmende Wirkungen beobachten wir mit Novocain 10^{-3} und Urethan $1{,}5 \times 10^{-2}$ und volle Lähmung mit Novocain 2×10^{-3} und Urethan 3×10^{-2}. Die Auswaschbarkeit war für Novocain nicht sehr gut. Die von Urethan war wesentlich besser. Es erscheint uns interessant, daß die wirksame Konzentration von Novocain schwächer ist als die am peripheren Nerven erforderliche. Die geringe Wirksamkeit des Urethans am Ganglion, verglichen mit der zentralnervösen Wirksamkeit an Wirbeltieren, entspricht der geringen Wirksamkeit des Äthylalkohols.

IV. Versuche am intakten Insekt (Blatta orientalis L.)

Die am isolierten Ganglien-Muskel-Präparat gewonnenen Erfahrungen sollten noch bestätigt werden in Versuchen am intakten Insekt, wobei wir besonders die Beeinflussung durch antagonistische Stoffe gegenüber den verschiedenen Insecticiden in verschiedenen Dosierungsbereichen, berücksichtigten.

Die antagonistisch lähmenden Stoffe wurden zum Teil vor, zum Teil nach den krampfwirksamen Stoffen verabreicht. Die zeitlichen Bedingungen der Wirkung wurden beachtet.

A. Methodik.

Für die Versuche wurde, da Gelbrandkäfer nicht in genügender Menge zur Verfügung standen, die leichter zu beschaffende Küchenschabe (Blatta orientalis L.) verwendet. Dieses Insekt ist auch besser geeignet als der Maikäfer (Melolontha vulgaris L.), da die Bewegungen von Blatta orientalis schneller sind und sich daher Störungen der Bewegung, der Koordination und Krampferscheinungen leichter erkennen lassen. Im Aufbau des Nervensystems hat die Küchenschabe weitgehende Ähnlichkeit mit dem Gelbrandkäfer.

Die Lösungen wurden in den Hinterleib mit einer feinen Kanüle injiziert. Zu einer Injektion wurden nur selten größere Flüssigkeitsmengen als 0,05 cm³ verwandt. Wurden zu einer Injektion größere Mengen genommen, so preßte das Tier einen Teil der Flüssigkeit heraus, so daß die Aufnahmebedingungen sehr ungenau wurden. Bei mehreren nacheinander folgenden Injektionen können mit Sicherheit nur die ersten bis zu einer Gesamtflüssigkeitsmenge von 0,2 cm³ verwendet werden.

B. Beobachtungen.

Die Ergebnisse der zahlreichen Versuche, über die bei KRUPP[11] genauer berichtet wird, können hier nur in einer tabellarischen Zusammenstellung festgehalten werden.

Tabelle 1.

Stoff	Dosierung	Wirkung
Äthyl-Alkohol	bis 10%	keine
DDT	10^{-4}—10^{-3}	Lähmung der Umkehrreflexe, ton.-klon. Krämpfe, stundenlang anhaltend.
γ-HCC	10^{-4}—10^{-3}	in Rückenlage erfolgt zunächst ein koordinierter Bewegungssturm, es folgen dann ton.-klon. Krämpfe, unterbrochen von kurzen Lähmungsintervallen.
E 605	10^{-4}—10^{-3}	ohne anfängliche Erregungsphase bildet sich nach 3—4 min eine zunehmende Extremitätenlähmung aus. Den Lähmungen folgen (bes. auf Reiz) ton.-klon. Krampfstadien.
Nicotin	ab 10^{-5}	Erregungen mit ton.-klon. Krämpfen werden schnell von totaler Lähmung abgelöst. Lähmungen sind in 5—6 Std spontan abgeklungen.
Pendiomid	bis 10^{-3}	keine
Buscopan	bis 10^{-3}	keine
Atropin	10^{-4}	keine
Curarin	10^{-3}	keine

In antagonistischen Versuchen mit Pendiomid*, Buscopan**, Curarin und Atropin ergaben sich keine positiven Erfolge gegenüber den Vergiftungserscheinungen mit den 3 Insecticiden. Nur die Ergebnisse der Versuche mit Nicotin können ein größeres Interesse beanspruchen im Zusammenhang mit der aufgenommenen Frage nach dem Angriffspunkt der Insecticide. Die tonisch klonischen Krämpfe nach γ-HCC und E 605 konnten durch Nicotin aufgehoben werden, während die nach DDT nicht beeinflußbar waren. Wurden die Tiere zuerst mit einer lähmenden Nicotinkonzentration behandelt und anschließend DDT, γ-HCC oder E 605 gegeben, so zeigte γ-HCC und E 605 keinen Effekt, während bei DDT sofort tonisch klonische Zuckungen auftraten.

* Pentamethyl-diäthyl-1,3-aza-penta-1,5-diammonium-dibromid (Ciba).

** 1-N-Butyl-Scopolammonium-bromid (Boehringer-Ingelheim).

Dieses unterschiedliche Verhalten kann nur darauf zurückzuführen sein, daß DDT neben seinem ganglionären zentralen Angriffspunkt auch noch peripher angreift im Gegensatz zu γ-HCC und E 605. Wenn Nicotin die zentrale Ganglienkette blockiert, so bietet sie γ-HCC und E 605 keinen Angriffspunkt mehr, während DDT noch die Möglichkeit besitzt, in der Peripherie erregend zu wirken.

Dieser Antagonismus wurde besonders genau quantitativ kontrolliert, um kritische Erwägungen über begrenzte antagonistische Wirkungsbedingungen auszuschließen.

Es zeigte sich, daß Nicotinkonzentrationen ab 10^{-4} γ-HCC-Wirkungen aufzuheben vermochten, während DDT-Konzentrationen mit 10^{-2} noch nicht beeinflußt wurden. Ferner ist es wichtig, daß die Nicotinkonzentration 10^{-4} annähernd der Konzentration entspricht, die am Ganglion antagonistisch wirksam war.

Auch die negativen Ergebnisse des Curarin-Antagonismus bedürfen noch einer kurzen Besprechung. Sie bestätigen ältere Literaturangaben.

Kuehne[18] stellte fest, daß Curare auch in ganz konzentrierten Lösungen auf Insekten nicht die geringste Wirkung hat. Vulpian[19], der an Schnecken, Anodonten, Krebsen, Insektenlarven und Blutegeln experimentierte, fand, daß bei allen so unverhältnismäßig große Curaredosen nötig sind, um eine Wirkung zu erzielen, daß man die Resultate überhaupt als zweifelhaft bezeichnen muß.

Dubuisson[20] schreibt, daß Curare keine Wirkung auf die neuromuskulären Übergangsstellen bei den Crustaceen wie auch bei den meisten Wirbellosen hat.

Lapicque[21] versuchte die geringe Curarewirksamkeit bei Wirbellosen daraus zu erklären, daß die Chronaxiewerte der Muskulatur z. B. bei Schnecken und Süßwassermuscheln etwa 100mal höher liegen als am Froschmuskel, so daß die Beeinflussung der Muskelchronaxie mit Erzeugung einer Heterochronaxie gegenüber den abgestimmten Chronaxiewerten der Nerven nicht möglich würde.

Ebenso wie die negativen Curarinergebnisse scheinen uns die negativen Atropinbefunde (trotz Prüfung sehr hoher Konzentrationen) gegen die Auffassung zu sprechen, daß das Acetylcholin am Insekt als Überträgerstoff der Nervenerregung angesehen werden kann wie bei den Wirbeltieren.

Erörterung der Befunde.

An dem neuen Bauchganglien-Präparat des Gelbrandkäfers gelang es, erregende Wirkungen mit den 3 geprüften Insecticiden in Konzentrationsbereichen auszulösen, die dem Wirkungsgrad bei der praktischen Verwendung solcher Stoffe entsprechen. Die Konzentrationen liegen auch in der Größenordnung der von Hoffmann und Lendle[4] sowie Schneider und Lendle[22] für diese Verbindungen im „Schwimmversuch" an im Wasser lebenden Insekten und niederen Tieren ermittelten Werte.

Aus einer kurzen tabellarischen Zusammenstellung der wirksamen Grenzkonzentrationen, in der auch das Ergebnis einer Prüfung auf Wirk-

samkeit am peripheren Abdominalmuskel nach Resektion der Ganglien aufgenommen ist, ergibt sich folgendes:

E 605 ist in 2 Größenordnungen wirksamer als DDT und γ-HCC, Nicotin dagegen wirkt in der gleichen Größenordnung. Diese beiden Stoffe sind auch dadurch ausgezeichnet, daß sie über erregende Wirkungen bei Konzentrationssteigerung in Lähmung übergehen. Bei Nicotin ist dafür

Tabelle 2. *Wirksame Grenzkonzentrationen.*

Stoff	Ganglien		Muskel
	erregend	lähmend	erregend
DDT	10^{-6}	—	2×10^{-6}
γ-HCC	2×10^{-6}	—	—
E 605	10^{-8}	10^{-4}	—
Nicotin	3×10^{-6}	10^{-5}	10^{-2}

die 3fache Konzentration, bei E 605 die 10000fache nötig. Für die beiden anderen Insecticide konnten Lähmungen nicht nachgewiesen werden, weil einer Dosensteigerung die geringe Löslichkeit im Wege stand.

Von den 4 geprüften Stoffen zeigt allein DDT eine muskuläre Wirkung bei Injektionen in das Abdomen. Die dafür nötige Konzentration lag völlig im Bereiche der am Ganglion wirksamen. Das Nicotin wirkte bei Injektion in den Muskel nicht kontraktionsauslösend, sondern in höchsten Konzentrationen vermag es eine tonische Starre mit anschließender Lähmung auszulösen. Die sichere wirksame Konzentration (10^{-2}) lag in einem noch höheren Bereich als die Konzentrationen, die beim Wirbeltiermuskel (10^{-4} bis 10^{-5}) eine tonische Starre hervorrufen.

Antagonistische Versuche mit verschiedenen lähmenden Stoffen zeigten, daß die modernen „Ganglienblocker" Stoffe, die spezifisch an Ganglien des vegetativen Nervensystems lähmen, hier am motorischen Ganglienpräparat die spontane Automatie und die Erregungsvorgänge unter der Einwirkung von Insecticiden nicht aufzuheben vermochten. Dagegen gelang dies mit dem Nicotin, welches auch am Wirbeltier vegetative Ganglien zu erregen und lähmen vermag in Konzentrationsbereichen, die den in der Tabelle festgehaltenen lähmenden Konzentrationen entsprechen. Diese lähmende Nicotinwirkung war beim Auswaschen reversibel. Am peripheren Abdominalmuskel wirkte Nicotin dagegen nicht antagonistisch zum DDT, woraus wohl der Schluß gezogen werden kann, daß hier auch keine peripheren ganglionären Elemente in der Muskulatur der Angriffspunkt der DDT-Erregung sind.

Bei Vergleich der am Ganglion des Gelbrandkäfers gefundenen Grenzwerte mit Ergebnissen, die Lendle und Schneider[6] am Regenwurmmuskel mit und ohne Ganglion für HCC und Hoffmann und Lendle[4]

für DDT und E 605 ermittelt haben, ergibt sich, daß die Wirksamkeit am Gelbrandkäfer für alle Stoffe wesentlich größer war (vgl. Tab. 3). Dieser Empfindlichkeitsunterschied ist bei der nahen Verwandtschaft im Aufbau des Nervensystems dieser Tierarten auffallend. Er kann hier nicht, wie am Warmblüter, auf Unterschiede der Resorption zurückgeführt werden. Eine Besonderheit liegt darin, daß am Regenwurmmuskel die Ausschaltung der Ganglienkette das Wirkungsbild nur wenig veränderte und die

Tabelle 3.

Stoff	Regenwurm-ganglion	Gelbrandkäfer-ganglion
γ-HCC	$1—5\times10^{-5}$	2×10^{-6}
techn. HCC	$2—5\times10^{-5}$	10^{-5}
DDT	10^{-3}	10^{-6}
E 605	$2—4\times10^{-5}$	10^{-8}

Empfindlichkeit quantitativ verschob. Auch nach Lähmung der Ganglien mit sehr hohen Nicotinkonzentrationen blieb HCC wirksam wie am ganglienfreien Muskelpräparat, das noch spontane Automatie zeigte.

Zusammenfassung.

Für die Analyse der Wirkungweise insecticider Stoffe wurde ein isoliertes Bauchmark-Ganglien-Präparat des Gelbrandkäfers (Dytiscus marginalis) beschrieben, an welchem DDT, HCC und E 605 spezifische erregende Wirkungen von irreversiblem Charakter zeigten. Auch Nicotin wirkte hier erregend und in höheren Konzentrationen lähmend, seine Wirkung war aber auswaschbar. Nicotin vermochte die Wirksamkeit der Insecticide am Ganglion aufzuheben, während moderne „Ganglienblocker" an diesen motorischen Ganglien unwirksam blieben.

Nur DDT zeigte in gleichem Konzentrationsbereich wie am Ganglienpräparat auch am peripheren Muskel erregende Wirkungen, die durch Nicotin nicht zu lähmen waren.

An intakten Insekten (Blatta orientalis L.) wurden diese Ergebnisse bestätigt.

Es ist zu bezweifeln, daß Acetylcholin auch bei Insekten für die Übertragung der Nervenerregung verantwortlich ist.

Literatur.

[1] Velbinger, H. H.: Pharmazie **4**, 165 (1949). — [2] Welsh, J. H., and H. T. Gordon: J. cellular comp. **30**, 147 (1947); zit. nach Ronas Ber. **175**, 160 (1949). — [3] Domenjoz, R.: Schweiz. med. Wschr. **74**, 952 (1944). — [4] Hoffmann, J., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 223 (1948). — [5] Schwarz, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 609 (1949). — [6] Schneider, H.-H., u.

L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 119 (1950). — [7] Herken, H.: Klin. Wschr. **28**, 582 (1950). — [8] McNamara, B. P., and St. Krop: J. of Pharmacol. **92**, 140 (1948). — [9] Velbinger, H.-H.: Pharmazie **2**, 268 (1947). — [10] Fritsch, H.: Inaugural-Dissertation, Leipzig 1950. — [11] Krupp, H.: Inaugural-Dissertation, Göttingen 1951. — [12] Wigglesworth, V. B.: The Pric. of Ins. Phys., London 1947, 3rd Edit. — [13] von Buddenbrock, W.: Grundriß der vergleichenden Physiologie, 1. Bd. 428. Berlin: Gebr. Bornträger 1937. — [14] Adrian, E.: J. of Physiol. **72**, 132 (1931). — [15] Haefliger, E.: Experientia **4**, 223 (1948); zit. nach Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **208**, 145 (1949). — [16] Langley, J. N., u. R. Magnus: J. of Physiol. (brit.) **33**, 341 (1905); zit. nach Dixon, A. R.: Hdb. exp. Pharm. Heffter-Heubner II/2, 681 (1924). — [17] Feldberg, W.: J. of Physiol. **83**, 103 (1935). — [18] Kuehne, W.: Arch. f. Anat. u. Physiol. 829, 1859; zit. nach Boehm, R.: Hdb. exp. Pharm. Heffter-Heubner, II/1, 182 (1920). — [19] Vulpian, A.: zit. nach Boehm, R.: Hdb. exp. Pharm. Heffter-Heubner II/1, 182 (1920). — [20] Dubuisson, M.: Fortschr. d. Zool. **2**, 418 (1937). — [21] Lapicque, L.: Semaine Hôp., Paris 1948, Nr. 66; zit. nach Sauerwein, W.: Zbl. Chir. **75**, 1110 (1950). — [22] Schneider, H.-H., u. L. Lendle: Pharmazie **5**, 382 (1950). — [23] Ber. kgl. sächs. Akad. der Wiss. **22**, 130 (1870).

Dr. H. Krupp, Göttingen, Geiststr. 9, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 242—252 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann).

Synergistisches Verhalten von Cardiazol, arterieller CO_2-Spannung und Wasserstoffionenkonzentration.

Von
H. F. Zipf und H. Keller.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. August 1951.)

Im Zusammenhang mit anders gerichteten Untersuchungen waren wir überrascht, in welchem Maße die kräftige blutdrucksteigernde Wirkung des Cardiazols sich verringerte, als wir die schlechte Atmung des narkotisierten Versuchstieres durch eine der „Norm" angepaßte künstliche Beatmung ersetzten. Die Wiedereinstellung der früheren schlechten Atemlage ergab erneut den gesteigerten pressorischen Effekt. Es ist bekannt, daß das Ausmaß und die Richtung der Cardiazolwirkung durch eine Reihe von verschiedenen Bedingungen beeinflußt werden. Vor kurzem haben Hahn und Rummel[5] auf die besonderen Erregungsbedingungen im dualistischen Zentrensystem und auf die Art der Zufuhr des Analeptikums hingewiesen. Eigene Beobachtungen und die im Schrifttum niedergelegten bisherigen Erfahrungen veranlassen uns, in dieser Mitteilung auf einige Faktoren veränderter zentraler Erregbarkeit gegenüber Cardiazol einzugehen, im besonderen auf die Rolle der Kohlensäure, aber auch der H'-Ionenkonzentration im Wirkungsmechanismus des Cardiazols. Wir stellten uns hierbei folgende Fragen: Ist die Anwesenheit einer gewissen CO_2-Konzentration in den nervösen Zentren die Voraussetzung für die Wirkung des Cardiazols? Wird die Cardiazolwirkung durch Anhäufung von CO_2 verstärkt? Gelten diese Beziehungen auch für die anderen erregenden Wirkungen des Cardiazols? Welche Rolle kommt der vermehrten Wasserstoffionenkonzentration zu? Die gleichzeitige Messung der CO_2-Spannung und der Wasserstoffionenkonzentration im arteriellen Blut bildete hierbei eine der methodischen Voraussetzungen. Im ganzen wurden 30 Versuche an 26 Katzen ausgewertet.

Versuchstechnik.

Versuchstiere: Katzen. *Narkose:* 60—75 mg/kg Chloralose (gelöst in 25% Urethan) peroral. Bei allen Versuchstieren erfolgte eine *Ausschaltung der Blutdruckzügler:* Halsnerven bds. durchschnitten, Carotisgabelstellen beiderseits entfernt.

* Herrn Prof. Dr. A. Jarisch (Innsbruck) zu seinem 60. Geburtstage in Verehrung gewidmet.

Blutdruckschreibung: Hg-Manometer an re. A. carotis communis angeschlossen. Registrierung der *Atemfrequenz:* MAREY-Kapsel. *Künstliche Beatmung:* STARLING-Pumpe. Zufuhr der CO_2-Luft-Gemische zur Trachealkanüle in Form eines konstanten Gasstromes. Intravenöse Injektion: V. jugularis externa. Alle *Blutentnahmen* erfolgten stets unter Paraffinöl aus der A. femoralis. Messung des arteriellen CO_2-Druckes: *Mikrotonometer nach* KROGH (in der Modifikation von WINTERSTEIN[17]). Messung des arteriellen CO_2-Gehaltes: *Manometrische Methode nach* VAN SLYKE. Messung des CO_2-Gehaltes der Beatmungsluft: *Manometrische Methode nach* HALDANE. Messung der arteriellen H'-Ionen-Konzentration: *Glaselektrode.*

Als Zeitpunkt für die Blutentnahme mußten wir die Pause (2—4 min) nach den jeweiligen Cardiazolinjektionen wählen. Die diese Maßnahme begleitenden Blutdrucksenkungen machten es unmöglich, die Entnahmen in die Injektionsphase oder kurz vor diese bzw. in die Wirkungsphase selbst zu legen. Die Cardiazolwirkungen und die gemessenen Blutänderungen können deshalb nur unter Berücksichtigung dieser zeitlichen Verschiebung miteinander in Verbindung gebracht werden.

Versuchsergebnisse.

I. Die Verstärkung der Cardiazolwirkung bei zentral geschädigter Atmung.

Um die eingangs erwähnte Verstärkung der pressorischen Cardiazolwirkung durch Atemschädigung zu überprüfen, und um experimentelle Vergleichsbefunde zu den Erfahrungen der Cardiazoltherapie bei klinischen Vergiftungen zu erhalten, verabreichten wir 3 Katzen intravenös soviel an Narkoticum, bis der gewünschte Grad der Atemschädigung eingestellt war.

Das Zusammenwirken einer starken Atemverlangsamung durch ein Narkoticum und Cardiazol sei an folgendem Beispiel beschrieben: Bei normaler Eigenatmung des leicht chloralisierten Tieres wirkte die kleine Dosis von 1 mg/kg i. v. nicht steigernd auf den Blutdruck. Das Bild änderte sich nach genügend hoher i. v. Verabreichung von Numal. Jetzt stieg der Blutdruck auf die gleiche Dosis an, während die geschädigte Atmung praktisch nicht beeinflußt wurde. Als wir durch künstliche Beatmung den Gaswechsel „normalen" Bedingungen annäherten, verlor Cardiazol wieder seine Wirkung. Diese Verstärkung der pressorischen Cardiazolwirkung könnte man durch einen Synergismus mit der Kohlensäure erklären, die durch die narkotische Atemverlangsamung künstlich gestaut wurde. Es erhebt sich die Frage, ob der Anstieg der CO_2-Spannung oder die parallel damit laufende Verschiebung der Blutreaktion nach dem Neutralpunkt hin verantwortlich zu machen ist. Wir konnten in 2 weiteren Versuchen (mit je 1 mg bzw. 3 mg/kg i. v.) feststellen, daß nach hypnotischer Atemverlangsamung die pressorische Wirkung gesteigert wurde.

II. Steigerung der Cardiazolwirkung bei künstlich herabgesetzter Atmungsgröße.

An künstlich beatmeten Versuchstieren ließ sich eine CO_2-Anstauung durch Langsamerstellen der Atempumpe bei Gleichhaltung des Volumens oder durch Reduzierung des Atemvolumens bei gleichbleibender Frequenz

herbeiführen. (Die so erzwungene Verringerung der Atemgröße wurde von den Tieren meist nicht ohne eine gewisse Erregung der Eigenatmung ertragen.) In 5 Versuchen zeigten 4 Tiere eindeutig eine erhebliche Steigerung der vorher schon vorhandenen pressorischen Cardiazolwirkung, ein Tier eine deutliche Abschwächung der vorher bestehenden blutdrucksenkenden Wirkung. Die angewandten Cardiazoldosen waren 3 und 1 mg/kg intravenös. Wurde die frühere Atemgröße erneut eingestellt, dann verringerte sich die Wirkung wieder auf den früheren Grad. Teilweise aber trat an Stelle der bisher pressorischen Ausgangswirkung eine leichte Blutdrucksenkung.

Alles in allem also die gleichen Befunde, wie bei der narkotisch bedingten Atemverlangsamung, und ein neuer Beweis, daß die Veränderung des Gaswechsels an der Verstärkung der pressorischen Cardiazolwirkung beteiligt ist.

III. Der Einfluß der CO_2-Beatmung auf die Cardiazolwirkung.

Die von früheren Autoren zur Prüfung der Erregbarkeit des Atem- und Vasomotorenzentrums benutzten 3-6-10% CO_2-Konzentrationen der Einatmungsluft erschienen uns für die weiteren Untersuchungen mit Cardiazol zu hoch. Wir wählten mit Absicht solche Konzentrationen aus (bis zu 1,1 Vol%), die die Ausgangslage des Blutdrucks, der einen empfindlichen Indicator darstellt, aber auch die Atmung, möglichst nicht erhöhten. Im ganzen handelte es sich um 17 Versuche an insgesamt 13 Versuchstieren. (In 3 Fällen kam es trotzdem vor der Cardiazolinjektion unter dem Einfluß von CO_2 zu einer geringen Erhöhung des Blutdrucks, und in 4 Fällen zu einer Erregung der Atmung.) Auch die Cardiazoldosen wurden klein gewählt (meist 1 mg/kg), derart, daß sie am nicht vorbehandelten Tiere entweder unwirksam waren, oder nur wenig blutdrucksteigernd wirkten. Um eine gleichmäßige Atmungslage beizubehalten, und um vor allem eine narkotisch bedingte Zunahme des arteriellen Sättigungsdefizites zu verhüten, wurde fast immer eine künstliche Beatmung durchgeführt, deren Frequenz sich nach der jeweiligen normalen Ausgangsspontanatmung richtete. Wir glauben durch diese Versuchsmaßnahme auch den O_2-Mangel, als Steuerungsfaktor der Zentren aus dem Kreise unserer Fragestellung ausgeschaltet zu haben (Literatur-Zusammenstellung siehe bei Schoedel[12]).

Die CO_2-Konzentration in der Einatmungsluft, die mit Sicherheit eine vorher unwirksame Cardiazoldosis von 1 mg/kg i. v. zu einem pressorischen Effekt steigerte, lag bei 0,7 Vol%. Sämtliche durchgeführten Versuche dieser Reihe, im ganzen 18, ergaben eine gegenseitige Beeinflussung von CO_2 und Cardiazol. Wir beobachteten im ganzen 4 *verschiedene Typen.*

Der *Typ I* war 5mal vertreten. In all diesen Versuchen erwies sich die gewählte Cardiazoldosis von 1 mg/kg i. v. *vor der CO_2-Beatmung* als *unwirksam*. Während der CO_2-Beatmung kam es durch die gleiche Cardiazoldosis zu einem *Erstauftreten einer Blutdrucksteigerung*, die von Tier zu Tier wechselte und in keinem festen Verhältnis zum CO_2-Gehalt der Beatmungsluft stand. Nach Abschalten der CO_2-Beimischung stellte sich nach einiger Zeit die frühere Wirkungslosigkeit der Cardiazolgabe wieder ein. Es war allerdings eine gewisse Wartezeit notwendig, um die

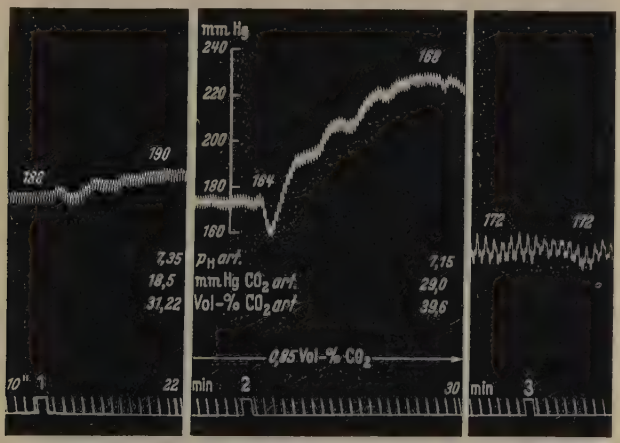


Abb. 1. Katze, ♂, 2,9 kg. Narkose: 75 mg/kg Chloralose (in 25% Urethan). Künstliche Beatmung. Blutdruck: Hg-Manometer an rechter Art. carotis communis. Halsnerven durchschnitten. Sinus caroticus bds. entfernt. Bei **1**, **2** und **3** je 1 mg/kg Cardiazol intravenös. Pulszahlen oberhalb der Blutdruckkurve. Beatmung mit einem 0,85 Vol% CO_2-Luftgemisch (-----→) während und nach der ersten Pause. Bestimmung des arteriellen CO_2-Druckes, -Gehaltes und p_H-Wertes am Beginn der jeweiligen Pause.

zugeführte CO_2 wieder zu entfernen. In den kurz hinter den Cardiazolinjektionen entnommenen arteriellen Blutproben konnten wir während der CO_2-Zufuhr sowohl für den CO_2-Gehalt und die CO_2-Spannung, als auch für die Wasserstoffionenkonzentration eine Zunahme feststellen.

Den *Typus II* beobachteten wir ebenfalls 5mal. Die gewählte Cardiazoldosis (1 mg/kg) hatte *vor der CO_2-Beatmung* eine schwache bis deutliche *pressorische Wirkung*. Diese wurde intensiv durch die Zugabe von CO_2 *verstärkt*. Nach Wegnahme der CO_2 kehrte entweder die frühere schwache Wirkung wieder zurück, oder der Blutdruck zeigte sich unbeeinflußbar, oder es kam (in einem Falle) sogar zu einer deutlichen Blutdrucksenkung. Ein typisches Beispiel ist in der *Abb. 1* dargestellt.

Beim *Typus III* führte die *vorher unwirksame Cardiazoldosis* von 1 mg/kg i. v. unter der CO_2-Beatmung zu einer *Blutdrucksenkung*. Diese trat nach Wegnahme der CO_2 nicht mehr in Erscheinung. Die *Abb. 2* gibt einen solchen Versuch wieder. Solche Beobachtungen wurden 4mal

angestellt. In einem dieser Fälle folgte auf die CO_2-bedingte Blutdrucksenkung ein Blutdruckanstieg über die Norm, so daß im ganzen ein diphasischer Blutdruckablauf zustande kam. Die Veränderungen im Blute verliefen in gleicher Richtung wie bei Typus I, II und IV.

Den *Typus IV* sahen wir 3 mal. Hier wurde in zwei Fällen die schwach pressorische (1 bzw. 2 mg/kg i. v.), im dritten Falle die stärker *pressorische Wirkung* (durch 3 mg/kg) *in eine Blutdrucksenkung umgewandelt*. Die

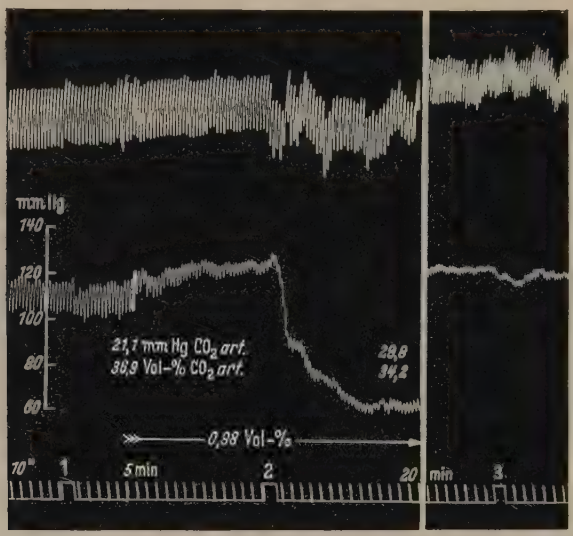


Abb. 2. Katze, ♀, 2,1 kg. Narkose: 75 mg/kg Chloralose (in 25% Urethan). Künstliche Beatmung (obere Kurve). Blutdruck: Hg-Manometer an rechter Art. carotis communis. Halsnerven bds. durchschnitten, Sinus caroticus bds. entfernt. Bei 1, 2 und 3 je 2 mg/kg Cardiazol intravenös. Beatmung mit 0,98 Vol% CO_2-Luftgemisch (------→) während und nach der ersten Pause. Bestimmung des arteriellen CO_2-Druckes, -Gehaltes und p_H-Wertes am Beginn der jeweiligen Pausen.

nachfolgenden Steigerungen über die Norm konnten der Blutdruckkurve einen diphasischen Charakter verleihen.

Insgesamt ließ sich also eine Veränderung der Blutdruckwirkung des Cardiazols feststellen, wenn wir die gleiche Dosis während einer Beatmung mit niedrigen CO_2-Konzentrationen verabreichten. In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich entweder um das erstmalige Auftreten einer blutdrucksteigernden Wirkung, oder um eine Verstärkung einer bereits vorher nachgewiesenen. Es konnte aber auch (in der Minderzahl der Fälle) unter CO_2 eine Blutdrucksenkung in Erscheinung treten oder, falls eine solche schon vorher vorhanden war, sich verstärken. Schließlich kam es vor, daß eine pressorische Wirkung sich unter CO_2 in eine depressorische umkehrte.

Weitere Zeichen des Zusammenwirkens von Cardiazol und CO_2 waren das *Hinzutreten motorischer Erregung und Erregung der Atmung* (siehe

z. B. Abb. 2). Wir sahen während des Zusammenwirkens von CO_2 und Cardiazol in 5 von 18 Versuchen Unruhe des Tieres, Einzelzuckungen oder gehäufte Zuckungen oder klonisch-tonische Krämpfe. Eine Erregung der Eigenatmung des Versuchstieres war an der Interferenz mit der Kurve der künstlichen Beatmung in 9 Fällen in wechselnder Stärke deutlich zu erkennen. Sowohl Zunahme von pressorischen wie auch von depressorischen Wirkungen konnte mit dem Bild vermehrter motorischer Erregung und Erregbarkeit, und erhöhter Tätigkeit der Eigenatmung verbunden sein. Wir hatten dabei den Eindruck, daß, wenn auch nicht immer, einer Blutdrucksenkung ein besonders starker Grad motorischer Erregung entsprach. Die gleiche Erfahrung beschreibt Hahn[4] (bei ihm auch weitere Literatur), ja er beobachtete bei Vertiefung der Narkose, nach dem Verschwinden der Krämpfe, ein Umschlagen der blutdrucksenkenden in eine blutdrucksteigernde Cardiazolwirkung. Die unter CO_2-Beatmung auftretenden Änderungen bzw. Steigerungen der Cardiazolwirkung waren, *in allen Versuchen* gleichartig, mit einer *Zunahme der CO_2-Spannung, des CO_2-Gehaltes* und *der Wasserstoffionenkonzentration* im arteriellen Blute verbunden.

Es seien hier nur Werte (vor und während der CO_2-Beatmung) aus solchen Versuchen angeführt, bei denen arterielle CO_2-Spannung (mm Hg) und p_H-Wert gleichzeitig bestimmt wurden (die unter CO_2 gemessenen Werte sind in Klammern gesetzt):

18,3 (21,8) / 7,32 (7,26) — 17,7 (25,3) / 7,23 (7,1) —
19,0 (25,0) / 7,3 (7,16) — 19,9 (28,3) / 7,4 (7,05) —
18,5 (29,0) / 7,35 (7,15) — 21,4 (27,6) / 7,35 (7,1) —
16,2 (29,0) / 7,3 (7,0) — 22,5 (35,8) / 7,3 (7,21) —
18,5 (25,0) / 7,33 (7,2).

Die Wiedergabe der gesamten Versuchswerte in Tabellenform ist leider aus Gründen der Raumersparnis unmöglich. Das Versuchsmaterial steht auf Wunsch jederzeit zur Verfügung. Die in den Abbildungen vorgelegten Beispiele können als typisch gelten. Das gleiche gilt bezüglich der unten folgenden Versuche mit Milchsäureinfusion.

Es war damit aber noch nicht entschieden, ob die erhöhte arterielle CO_2-Spannung primär und spezifisch an dem Zusammenwirken mit der zentral angreifenden Cardiazoldosis beteiligt war, oder ob der eigentliche Wirkungsfaktor von der, durch CO_2-Zufuhr ausgelösten Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration dargestellt wurde. Wirkte also CO_2 synergistisch auf Grund eines spezifischen Mechanismus an den Zentren oder unspezifisch im Sinne der Reaktionstheorie?

IV. Die Änderung der Cardiazolwirkung durch Milchsäureinfusion.

In 5 Versuchen entwickelte sich während der Milchsäureinfusion zunächst eine zunehmende Tonisierung der Zentren, erkennbar am allmählichen Anstieg des Blutdruckes und der Pulsfrequenz. Eine Erregung der Atmung konnte an der Kurve der künstlichen Beatmung

nicht abgelesen werden. Bei dem in *Abb. 3* dargestellten Versuche stellte sich der Blutdruck nach einiger Zeit wieder auf das Ausgangsniveau ein. Nur die Pulsfrequenz blieb erhöht. Die vor der Infusion unwirksame Cardiazoldosis von 1 mg/kg i. v. erwies sich jetzt als außerordentlich blutdrucksteigernd. Auch die Pulsfrequenz nahm weiter zu. Die Atmung

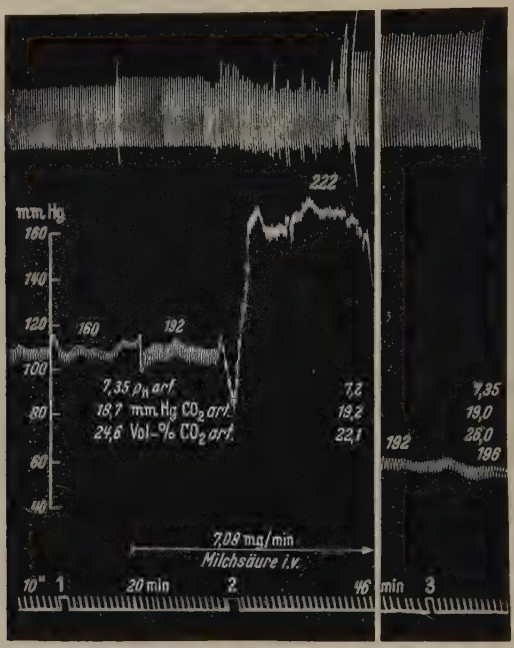


Abb. 3. Katze, ♂, 2,3 kg. Narkose: 75 mg/kg Chloralose (in 25% Urethan). Künstliche Beatmung Blutdruck: Hg-Manometer an rechter Art. carotis communis. Halsnerven bds. durchschnitten. Sinus caroticus bds. entfernt. Bei 1, 2 und 3 je 1 mg/kg Cardiazol intravenös. Pulszahlen oberhalb der Blutdruckkurve. In der ersten Pause und danach intravenöse Dauerinfusion von 3,08 mg/kg/min. Milchsäure (------→), insgesamt 58,5 mg/kg. Bestimmung des arteriellen CO_2-Druckes, -Gehaltes und p_H-Wertes am Beginn der jeweiligen Pausen.

wurde miterregt. Genügend lange Zeit nach Abstellung der Infusion war der synergistische Effekt wieder verschwunden. In der Zwischenphase vor beendeter Eliminierung der Milchsäure ließ sich ein entsprechend abgeschwächter Kombinationseffekt nachweisen. Die p_H-Verschiebungen nach dem Neutralpunkte hin waren in jedem Versuche deutlich. Die CO_2-Spannung veränderte sich jedoch nicht über den Bereich der Fehlerbreite hinaus.

In einem der Versuche *(Abb. 4)* ließen wir eine größere Menge Milchsäure (im gesamten 89,6 mg) einlaufen. Die übliche Wirkungssteigerung zeigte sich weder bei der zweiten noch bei der um das 4fache erhöhten dritten Cardiazolinjektion (2 mg/kg). Einige Zeit nach Abstellung der Infusion konnte der Effekt mit der anfänglichen Dosis (0,5 mg/kg) nach-

gewiesen werden. Durch übermäßige Säureinfusion war hier ein Stadium abgesunkener Erregbarkeit der Zentren eingestellt worden. Puls und Blutdruck waren darin nicht wie sonst erhöht, sondern etwas abgesunken. Die Erregbarkeit kehrte im Laufe der Eliminationsphase zurück, was auch an der Wiedererhöhung des Blutdruckes zur Norm und an der über diese hinaus erfolgenden Pulsbeschleunigung erkennbar war. Der Synergismus Milchsäure-Cardiazol kam jetzt in einer kräftigen Blut-

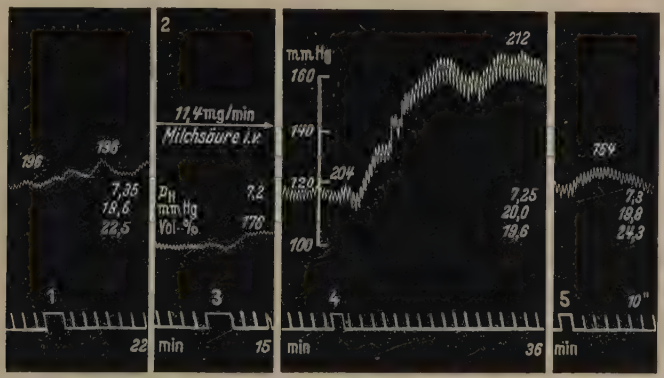


Abb. 4. Katze, ♀, 2,8 kg. Narkose: 75 mg/kg Chloralose (in 25% Urethan) peroral. Künstliche Beatmung. Blutdruck: Hg-Manometer an rechter Art. carotis communis. Halsnerven bds. durchschnitten. Sinus caroticus bds. entfernt. Intravenöse Injektion von Cardiazol pro Kilogramm bei 1 und 2: je 0,5 mg, bei 3 2 mg, bei 4: 0,5 mg, bei 5: 0,5 mg. Pulszahlen oberhalb der Blutdruckkurve. Vom Beginn der ersten Pause an intravenöse Dauerinfusion von 11,4 mg/kg Milchsäure pro Minute (------→), insgesamt 89,6 mg. Bestimmung des arteriellen CO_2-Druckes, -Gehaltes und p_H-Wertes am Beginn der jeweiligen Pause.

drucksteigerung deutlich zur Geltung. Längere Zeit nach Beendigung der Infusion zeigte sich Cardiazol wie zu Versuchsbeginn wieder wirkungslos.

Rein äußerlich gesehen, ließen sich die Kombinationsversuche CO_2 + Cardiazol und Milchsäure + Cardiazol kaum unterscheiden. Die Kurvenformen glichen sich völlig und umfaßten auch die kurzdauernde, anfängliche Senkung.

Besprechung.

In der ärztlichen Praxis und Klinik hat sich Cardiazol ein weites Feld der Anwendung erobert. Dabei fällt immer wieder der Hinweis auf, daß Cardiazol in bestimmten Fällen auf Schädigungen des Kreislaufes eine besonders gute Wirkung zeige. Im einzelnen wird eine günstige Wirkung gegenüber einem durch Morphin, Narkotica, Schlafmittel oder Alkohol geschädigten Atem- bzw. Vasomotorenzentrum, bei intrauteriner, Neugeborenen- und Ertrinkungsasphyxie, bei schwerer Pneumonie, bei Lungenödem, Stauungslunge, überhaupt bei Herzschwäche mit Stauungserscheinungen angegeben. Diesen pathologischen klinischen Zuständen kann als gemeinsam gelten, daß bei ihnen entweder durch eine zentrale Atemlähmung, oder durch eine physikalisch bedingte Störung des Gasaustausches eine Anstauung der Kohlensäure im Blute und in den Geweben zustande kommt. Im Tierexperiment ergab sich eine besonders gute Wirkung von Cardiazol nach

vorheriger Lähmung des Atemzentrums durch Morphin oder Schlafmittel (Hildebrandt[6], Schoen[13], Trendelenburg[15], Behrens und Reichelt[1], Lendle[9]). Auch für CO_2 wird darauf hingewiesen (Dressler[2]), daß am morphinisierten Kaninchen überschwellige CO_2-Konzentrationen nicht geringer als am normalen, sondern eher stärker atmungssteigernd wirken.

Aus unseren Versuchen *an atmungsgeschädigten Katzen* ergab sich, daß *blutdruckunwirksame Cardiazoldosen erst in der Phase der Atemschädigung* (bzw. künstlich reduzierten Atmung) deutliche Effekte auslösten, und zwar im *pressorischen* und *depressorischen* Sinne. Bei *wirksamen Dosen* trat *entweder* eine erhebliche *Zunahme der Blutdrucksteigerung* in Erscheinung, *oder* es erfolgte eine *Wirkungsumkehr* im *depressorischen* Sinne. In einigen dieser Fälle beobachteten wir auch einen *diphasischen* Blutdruckablauf. Der Kombinationseffekt verschwand nach Wiederherstellung ausreichender Beatmungsverhältnisse. Die Gasanalyse des arteriellen Blutes zeigte eine mit dem Steigerungseffekt parallel gehende Zunahme des CO_2-Gehaltes, des CO_2-Druckes und der Wasserstoffionenkonzentration. Prinzipiell gleichgerichtet verliefen die Versuche unter stark *verlangsamter künstlicher Beatmung.*

In unseren Kombinationsversuchen mit Cardiazol und *Einatmung von CO_2-Luftgemischen* konnten in noch besserem Ausmaße und differenzierter die gleichen Befunde wie bei herabgesetzter Atemlage erhoben werden.

Es war festzustellen, ob für diese Effekte die Vermehrung der Wasserstoffionenkonzentration verantwortlich zu machen war. Wir prüften deshalb mit dem Vorgehen von Winterstein[17], nämlich Säureinjektion an „chemoreceptorenlosen" Katzen (beiderseitige Halsnervendurchschneidung und Resektion der beiden Carotissinusgegenden) die Wirkung von Cardiazol. Unsere Infusionsversuche mit Milchsäure erbrachten besonders eindrucksvolle Blutdrucksteigerungen durch vorher unwirksame Cardiazoldosen. Im Gegensatz zu Winterstein senkte sich bei intravenöser Infusion von 3%iger Milchsäure die CO_2-Spannung im arteriellen Blut nicht, sondern nahm eher gering zu. Dies erklären wir mit folgenden Umständen: Winterstein ließ seine Tiere spontan atmen. Durch die von ihm beobachtete Zunahme der Atemgrößen wurde die aus ihren Bindungen verdrängte CO_2 durch die Lungen verstärkt abgegeben. Bei unseren Tieren wurde hingegen mittels der Starling-Pumpe die Atemgröße möglichst konstant gehalten. Unsere Versuche erlauben es uns also keineswegs, uns der Theorie der indirekten CO_2-Wirkung (Zunahme der H'-Ionen) anzuschließen. Ganz im Gegenteil neigen wir auf Grund verschiedener Nebenbefunde der Theorie der direkten, spezifischen CO_2-Wirkung zu.

Mit Sicherheit konnten wir aus *allen* angeführten Befunden folgern, daß *ein Erstauftreten oder eine Verstärkung oder Umkehrung der Blutdruckwirkung,* und über diese hinaus, *der atmungerregenden und krampf-*

auslösenden Wirkung des Cardiazols nur dann in Erscheinung trat, wenn entweder eine Erhöhung der arteriellen CO_2-Spannung und eine Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration, oder die letztere allein nachzuweisen war.

Als wesentlich und einschränkend scheint uns bei allen Messungen zu sein, daß wir einmal nur stichprobenweise die Blutwerte und nicht die Verhältnisse im Zellinnern messen, und daß weiterhin die CO_2-Spannung über dem Blut gemessen wird, wir aber nicht wissen, ob nicht die ionisierten Anteile der Kohlensäure eine wesentliche Rolle spielen.

Die bisherigen *Literaturbefunde* über das Zusammenwirken von CO_2 und Analeptika lassen sich nach 2 Gesichtspunkten ordnen:

1. Erregbarkeitssteigerung der medullären Zentren gegenüber CO_2 durch vorausgegebene Analeptikadosen (Wieland und Mayer[16], Junkmann und Stross[7], van Esveld[3] und Raab[11]).

2. Wirkungsänderung von Analeptika durch vorhergehende CO_2-Beatmung (Dressler[2], Stephany und Schmitt[14], Kornmüller und Noell[8], Pilcher und Sollmann[10]).

Nach den eigenen Versuchsergebnissen und den in der Literatur auffindbaren Befunden können wir für die Praxis die Folgerung ziehen, daß in *allen Fällen von CO_2-Anstauung* bzw. *Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration in den nervösen Zentren mit einer Verstärkung der Wirkung von Cardiazol*, vielleicht auch anderer zentral angreifender Analeptika, zu rechnen ist. Bemerkenswert ist die völlige Übereinstimmung des tierexperimentell geprüften Dosenbereiches mit dem am Menschen angewandten.

Für die tierexperimentelle Beurteilung der Wirkung von zentral angreifenden Analeptika ergibt sich zwangsläufig die Forderung, die Bedingungen des Gaswechsels mit zu berücksichtigen, wenn man plötzlich andere Wirkungen der gleichen Cardiazoldosis beobachtet. Hierbei wird Auswahl und die Dosierung des Narkoticums eine besondere Rolle spielen.

Es kann wohl als sehr wahrscheinlich angenommen werden, daß die Cardiazolwirkung keine direkte ist. Entweder handelt es sich um eine Erregungssteigerung der Zentren gegenüber CO_2, was voraussetzt, daß diese in genügender, d. h. nun schwellig wirkender Konzentration vorhanden ist. Oder man denkt an eine Wirkung auf enzymatische Prozesse, z. B. auf die Carbonanhydrase, die die Reaktion $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$ und $CO_2 + OH' \rightleftharpoons HCO'_3$ katalysiert. Eine Störung dieser Fermenttätigkeit muß zu erheblichen Veränderungen im Zellinnern führen. Solche können aufzufassen sein als Störungen der Ionisation, z. B. der H-, HCO_3- aber auch anderer Ionen, damit zusammenhängend als Änderungen des cellulären CO_2-Druckes, schließlich auch als Veränderungen des O_2-Gehaltes. Einer oder mehrere dieser Faktoren können dann den Reiz darstellen, auf den die betroffene Zelle bzw. der Zellverband zunächst in typischer Weise reagiert. Übersteigt dieser Reiz eine gewisse Breite, so kommt es zu einer Zellvergiftung im Sinne einer Lähmung des Gebietes. Wir stellen uns zur Zeit die Frage, ob die verschiedenen Analeptika möglicherweise diese komplexe Fermenttätigkeit beeinflussen.

Wir sind Fräulein Thilde Driehsen für ihre unermüdliche und korrekte Mithilfe zu großem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

An der vagotomierten und ihrer Carotissinusreceptoren beraubten Katze wird Ausmaß und Richtung der Cardiazolwirkung durch eine Reihe von Versuchsbedingungen verändert:

Durch *narkotische Schädigung der Atmung* mittels Numal, oder durch künstliche Verringerung der Atmungsgröße (Starling-Pumpe) konnten blutdruckunwirksame Cardiazoldosen pressorisch wirksam, blutdrucksteigernde in ihrer Wirkung gesteigert werden.

Unter künstlicher *Beatmung mit CO_2-Luftgemischen* ergaben sich vier Arten von Kombinationswirkungen mit Cardiazol: 1. Unwirksame Cardiazoldosen wirkten erstmalig blutdrucksteigernd. 2. Vorher blutdrucksteigernde Dosen wurden in ihrer Wirkung erheblich verstärkt. 3. Unwirksame Dosen lösten erstmalig eine Blutdrucksenkung aus. 4. Pressorisch wirksame Dosen veränderten ihre Wirkung in eine depressorische. Bei einer größeren Zahl der Versuchstiere machte sich der Synergismus zusätzlich im Hinzutreten von Zeichen der Erregung von Motorik und Atmung bemerkbar. Im arteriellen (Femoralis-)Blut konnte unter der CO_2-Beatmung eine Zunahme der CO_2-Spannung und der Wasserstoffionenkonzentration nachgewiesen werden.

Während *intravenöser Infusion von Milchsäure* zeigte sich der gleiche, starke, pressorische Synergismus wie unter CO_2-Beatmung. Im arteriellen Blute war die Wasserstoffionenkonzentration deutlich vermehrt, die CO_2-Spannung jedoch nicht über die Fehlerbreite hinaus verändert.

Für das Zustandekommen der Wirkungssteigerung von Cardiazol werden sowohl die spezifische CO_2-Wirkung, als auch die unspezifische der H-Ionen diskutiert.

Literatur.

[1] Behrens, B., u. E. Reichelt: Klin. Wschr. **1933**, 1860. — [2] Dressler, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **160**, 238 (1931). — [3] Esveld, L. W. van: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **149**, 348 (1930). — [4] Hahn, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 472 (1941). — [5] Hahn, F., u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 325 (1950). — [6] Hildebrandt, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **116**, 110 (1926). — [7] Junkmann, K., u. W. Stross: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **131**, 1 (1928). — [8] Kornmüller, A. E., u. W. Noell: Pflügers Arch. **247**, 660, 713 (1944). — [9] Lendle, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 408 (1936). — [10] Pilcher u. Sollmann: J. of Pharmacol. **6**, 331 (1914/15). — [11] Raab, W.: Klin. Wschr. **1936**, 851. — Z. klin. Med. **1936**, 468. — [12] Schoedel, W.: Naturforschung und Medizin 1939—46, Physiologie Tl. II, S. 41. — [13] Schoen, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **113**, 275 (1926). — [14] Stephany, H., u. N. Schmitt: Inaug.-Diss., Heidelberg 1946. — [15] Trendelenburg, P.: Med. Klin. **1929**, 1573. — [16] Wieland, H., u. R. L. Mayer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **95**, 5 (1922). — [17] Winterstein, H.: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 80 (1950).

Prof. Dr. H. F. Zipf, Bonn, Pharmakol. Institut der Universität, Reuterstr. 2b.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 253—261 (1952).

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. Main (Direktor: Prof. Dr. K. Felix). — Arbeitsgruppe Prof. Dr. O. Riesser †

Untersuchungen über Glykogenbildung und deren Beeinflussung an Leberschnitten von Ratten*.

Von

Wulf Lübken.

(Eingegangen am 20. September 1951.)

Wir beschäftigten uns mit dem Glykogenaufbau aus Glukose und seiner Beeinflussung durch Strophanthin, außerdem mit der Glykoneogenese aus der Aminosäure *dl*-Alanin und der Wirkung von Hormonen der Bauchspeicheldrüse und der Nebennierenrinde auf diesen Vorgang.

Alle Versuche wurden an Leberschnitten von Ratten durchgeführt, die sich seit den Untersuchungen von Bach und Holmes[1], Cross und Holmes[2] und Ostern, Herbert und Holmes[3] als geeignet erwiesen haben, um die Leberglykogensynthese zu studieren.

Zunächst gingen wir der Frage nach, ob eine Glykogensynthese in Leberschnitten zu beobachten sei, wenn die Glukosekonzentration in der Suspensionslösung der normalen Blutzuckerhöhe entspreche. Die früheren Untersuchungen über den Glykogenaufbau aus Glukose in Leberschnitten waren durchweg mit höheren Konzentrationen von 0,5 und 1% Glukose durchgeführt worden (3, 4, 5). In der Tat erweisen sie sich auch als geeigneter, obwohl auch mit niederen Konzentrationen ein deutlich meßbarer Glykogenaufbau im Leberschnitt erfolgt.

Die Beeinflussung dieser Stärkebildung durch Strophanthin interessierte uns deshalb, weil Ther[6] fand, daß im isolierten Muskel (Zwerchfell) der Ratte das Strophanthin eine deutliche Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel entfaltet. Während der genannte Autor in reiner Sauerstoffatmosphäre eine Hemmung der Glykogensynthese aus Glukose durch Strophanthin beobachtete, zeigte sich bei Atmung in Luft (also 20% Sauerstoff) eine deutliche Verbesserung des Glykogenaufbaues. Auch in Leberschnitten ist eine Beeinflussung der Stärkebildung durch Strophanthin zu beobachten, wie im folgenden gezeigt werden wird.

Die Bildung von Glykogen aus glukoplastischen Aminosäuren in Leberschnitten wurde bereits von Bach und Holmes[1] festgestellt. Sie konnten auch die hemmende Wirkung des Insulins auf diesen Vorgang erstmalig in vitro nachweisen, und zugleich vermochten sie als dessen Angriffspunkt die Desaminierung der Aminosäuren zu erkennen. Der Einfluß der Nebennierenrindensteroide auf den Glykogenaufbau aus Aminosäuren scheint der Wirkung des Insulins entgegengesetzt in einer Förderung des Vorganges zu bestehen. Denn bei Zugabe von Desoxycorticosteronglukosid

* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft durchgeführt.

zum Medium während der Atmung beobachteten Chiu und Needham[7] in Leberschnitten eine Vermehrung des nicht an Eiweiß gebundenen Stickstoffs.

Wir haben deshalb die Wirkung des Desoxycorticosterons, des Insulins sowie deren gegenseitige Beeinflussung in Hemmung und Förderung der Glykoneogenese aus dl-Alanin mit einfacher Versuchsanordnung studiert.

Methodik.

Zu den Untersuchungen wurden Albinoratten beiderlei Geschlechts im Gewicht von 150—200 g, die keine besondere Diät erhielten, nach 24stündigem Hunger verwendet. Um den Einfluß von Tagesschwankungen auszuschalten, wurden die Versuche stets in den gleichen Tagesstunden durchgeführt. Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet, entblutet, die Leber entnommen und in kalte Suspensionslösung gelegt. Im Kühlraum wurden die Leberlappen mit der von Voigt[8] angegebenen Apparatur geschnitten. Dadurch wurden konstante Schnittdicken (etwa 450μ) bei minimal verletzter Schnittfläche erzielt. Aus den erhaltenen Schnitten wurden mittels Stanzmessers kreisrunde Scheiben ausgestanzt, deren Gewicht bei Voruntersuchungen gut übereinstimmte (Differenz: $\pm$ 1 mg des Feuchtgewichtes). Während dieser Zeit wurden die Schnitte dauernd in mit Sauerstoff durchperlter kalter Suspensionslösung gehalten, wenn nicht besondere, noch zu schildernde Vorbereitungen der Schnitte durchgeführt wurden.

Gleiche Mengen so vorbereiteter Schnitte wurden dann in Reaktionsgefäße (Warburg-Gefäße) getan. Die in den Gefäßen befindliche von uns benutzte Suspensionslösung war die von Buchanan, Hastings und Nesbett[9] angegebene „intracelluläre" Lösung. Sie entspricht in ihrer Zusammensetzung eher der intracellulären als der extrazellulären Flüssigkeit, ist kaliumreich und natriumfrei. Ihre Brauchbarkeit bei der Leberglykogensynthese wurde von späteren Autoren[4, 5] bestätigt.

Interessant ist, daß sich im Gegensatz dazu bei Versuchen an Rattenzwerchfellen, also im Muskel, die Ringer-Lösung am besten bewährte, die ja eher einer extracellulären Flüssigkeit entspricht.

Bei unseren Versuchen wurden in jedes Warburg-Gefäß 1,8 ml der genannten intracellulären Lösung von der folgenden Zusammensetzung gegeben:

$CaCl_2$ 5,6 mM/Liter,
KCl 135 mM/Liter,
$KHCO_3$ 43 mM/Liter.
Das p_H betrug (elektrometrisch) 7,4.

Der Einsatz des Warburg-Gefäßes wurde mit 0,1 ml NaOH (10%) beschickt, als Gasfüllung während der Atmung wurde stets 100% Sauerstoff benutzt. Die Atmung der Schnitte wurde nach der geläufigen Warburg-Methode[10] gemessen. Da signifikante Änderungen des (stets gemessenen) Sauerstoffverbrauches unter Einfluß von Wirkstoffen nicht zu beobachten waren, wird die Atmungsmessung im folgenden unberücksichtigt gelassen.

Die Reaktionsgefäße wurden nach Beschickung mit Leberschnitten und Sauerstoff bei 37° C im Warburg-Apparat mit einer Frequenz von 80/min 90 min lang geschüttelt. Im Anschluß daran wurden die Schnitte aus den Gefäßen entnommen und ihr Glykogengehalt nach der Methode von Good, Kramer und Somogyi[11] ermittelt, bei Anwendung der Hydrolyse mit 5n-Schwefelsäure nach Sahyun[12], Neutralisierung mit Natronlauge und Bestimmung der Glukose nach Hagedorn und Jensen[13]. Die Glykogenausgangswerte wurden bestimmt, wenn die Reaktionsgefäße in den Warburg-Apparat eingehängt wurden. Der Zusatz von Glukose, Alanin, Strophanthin zur Suspensionsflüssigkeit in einzeln angegebener Konzentration erfolgte vor Einfüllen der Schnitte in die Warburg-Gefäße.

Beeinflussung der Glykoneogenese aus dl-Alanin durch Insulin und Desoxycorticosteronglukosid.

In einer Reihe von Versuchen wurden die Schnitte vor dem Einfüllen in die WARBURG-Gefäße zur Atmung in einer insulinhaltigen Lösung (stets 0,2 E/ml) in einem kleinen Gefäß bei 25° ± 1° C für 1 min inkubiert, danach für 5 min in insulinfreier Lösung in mehreren aufeinanderfolgenden Gefäßen gründlich ausgewaschen und für die Atmung gleichzeitig mit den übrigen Schnitten in WARBURG-Gefäßen inkubiert, welche kein Insulin enthielten. Feste und schnelle chemische Bindung des Insulins, die nicht auswaschbar war, wurde mit dieser Versuchsanordnung von STADIE c. s.[14] am isolierten Rattenzwerchfell beobachtet. In anderen Versuchen wurde das Insulin, wie im einzelnen bei den Ergebnissen bekanntgegeben, 5 min nach Beginn der Atmung aus der dem WARBURG-Gefäß anhängenden Birne der Suspensionsflüssigkeit zugesetzt. Hingegen wurde das in den Versuchen verwendete Desoxycorticosteronglukosid (Percorten) durchweg vor Beginn der Atmung dem Medium hinzugefügt. Lediglich in einigen Versuchen, die klären sollten, ob auch das Percorten, wie das Insulin, chemisch schnell an die Zelle gebunden wird, wurden Leberschnitte, wie oben für das Insulin beschrieben, für 1—5 min in percortenhaltiger Lösung (100 γ/ml) inkubiert, anschließend gründlich für 5 min ausgewaschen und ohne weiteren Percortenzusatz gleichzeitig mit den übrigen Schnitten zur Atmung in die WARBURG-Gefäße getan. Während der Inkubation von Schnitten vor Beginn der Atmung, von der wir eben berichteten, wurde stets Sorge getragen, daß die übrigen Schnitte ebenso wie erstere behandelt wurden, d. h. zur gleichen Zeit in den gleichen, nur nicht die erwähnten Wirkstoffe enthaltenden Suspensionslösungen bei gleichen Temperaturen gehalten wurden und zugleich mit jenen zur Atmung gelangten.

Ergebnisse.

1. Glykogenaufbau aus Glukose in verschiedener Konzentration.

Bereits bei einer Konzentration der Glukose von 0,1% in der Suspensionsflüssigkeit, also dem physiologischen Blutzuckerniveau, bemerken wir einen meßbaren, wenn auch nicht sehr erheblichen Glykogenansatz in Leberschnitten von Hungerratten. Der Ansatz wird zunächst bis zu einer Glukosemenge von 0,25% bei ähnlichen Ausgangswerten nicht größer, erst eine Erhöhung der Konzentration auf 0,5% bedingt eine erhebliche Steigerung des Stärkeaufbaus aus Traubenzucker. Mit dieser Glukosekonzentration scheint dann allerdings auch die optimale Ansatzmöglichkeit erreicht, eine Steigerung auf 1% bringt keine meßbare Vermehrung der Synthese mit sich (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Glykogenaufbau in Leberschnitten von Ratten nach 24 Stunden Hunger bei verschiedener Glukosekonzentration in der Suspensionsflüssigkeit. 90 min Atmung bei 37° C. Glykogenwerte in mg pro 100 mg Lebergewebe. Eingeklammerte Zahlen Anzahl der Versuche.*

Glucosekonzentration	Anfangswert	Endwert
0,1% (7)	0,194	0,323
0,15% (7)	0,163	0,380
0,2 % (6)	0,170	0,368
0,25% (9)	0,221	0,356
0,5 % (23)	0,200	0,674
1,0 % (6)	0,196	0,698

2. Beeinflussung des Glykogenaufbaues aus Glukose durch Strophanthin.

Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, begünstigt das Strophanthin den Glykogenaufbau aus Glukose deutlich. Gleichzeitig wird er aber auch, soweit ein Versuch an Schnitten einer Rattenleber Schlüsse zuläßt, die Glykogenerhaltung in Leberschnitten von Tieren, die nicht gehungert haben, durch Zusatz von Strophanthin zur glukosehaltigen Nährlösung verbessert.

Tabelle 2. *Glykogenaufbau in Leberschnitten von Ratten nach 24 Stunden Hunger. Substrat Glukose in verschiedener angegebener Konzentration. Förderung des Glykogenaufbaues durch Strophanthin (2,5 γ/ml). Unter dieser Tabelle Einzelversuch: Verbesserung der Glykogenerhaltung in Leberschnitten von normal ernährten Ratten, Glukose in angegebener Konzentration, 2,5 γ/ml Strophanthin. Atmung in allen Fällen 90 min bei 37° C. Glykogenwerte in mg pro 100 mg Lebergewebe.*

Versuch Nr.	Glucose %	Ausgangswert	Endwerte	
			Glucose	Glucose + Strophanthin
1.	0,25%	0,150	0,320	0,500
2.	0,50%	0,130	0,420	0,590
3.	0,50%	0,500	1,140	1,480
4.	0,50%	0,100	0,410	0,720
5.	0,50%	0,070	0,540	0,640
6.	0,15%	0,170	0,430	0,540
7.	0,25%	0,090	0,210	0,380
	0,15%	0,090	0,190	0,270
8.	0,50%	0,280	0,590	0,770
	0,10%	0,280	0,470	0,560
9.	0,15%	0,290	0,660	0,870
	0,10%	0,290	0,520	0,620
10.	0,15%	0,110	0,290	0,420
	0,10%	0,110	0,250	0,350
Mittel:		0,190	0,460	0,623
	0,15%	2,270	1,460	1,960
	0,10%	2,270	0,940	1,260

3. Beeinflussung der Glykogensynthese aus dl-Alanin durch Insulin und Desoxycorticosteronglukosid.

In der erwähnten Versuchsanordnung von Stadie u. M.[14] prüften wir die schon bekannte Hemmung der Glykoneogenese aus dl-Alanin durch Insulin (Tabelle 3). Wir konnten dabei zunächst bestätigen, daß in Leberschnitten von Ratten in der Tat eine Glykoneogenese aus dl-Alanin zu beobachten ist. Dieser Vorgang wird durch vorherige Behandlung mit Insulin in einer Konzentration von 0,2 E/ml deutlich gehemmt. Damit werden die schon erwähnten Befunde von Bach u. Holmes[1] bestätigt. Darüber hinaus aber zeigt unsere Versuchsanordnung, daß auch

an die Leberzelle das Insulin nach kurzer Zeit fest gebunden wird und seine weitere Anwesenheit in der Suspensionslösung während der Atmung zur Wirkungsentfaltung nicht notwendig ist.

Tabelle 3. *Glykogenaufbau in Leberschnitten von Ratten nach 24 Stunden Hunger. Substrat 0,5% dl-Alanin. Schnitte in der Kolumne 3 vor Beginn der Atmung in Insulinlösung (0,2 E/ml) 1 min inkubiert, anschließend 5 min ausgewaschen. Kein Insulin in der Suspensionsflüssigkeit während der Atmung. 90 min Atmung bei 37° C. Glykogenwerte in mg pro 100 mg Lebergewebe.*

Ausgangswerte	Endwerte	
	Alanin	Alanin + Insulin
0,150	0,280	0,190
0,220	0,350	0,250
0,080	0,200	0,120
0,150	0,290	0,170
0,130	0,270	0,140
0,130	0,310	0,160
Mittel 0,143	0,283	0,172

Wir untersuchten dann die Wirkung des Percorten auf diesen Vorgang. Dabei stellte sich, wie aus den Versuchen der Tabelle 4 hervorgeht, eine meßbare Verbesserung der Glykogenbildung aus dl-Alanin heraus, die jedoch nicht zu bemerken war, wenn das Percorten in der gleichen Versuchsanordnung wie das Insulin lediglich für 1 oder 5 min mit den Leberschnitten *vor* der Beatmung in Verbindung gebracht wurde (Tabelle 5).

Schließlich wurde die Frage der gegenseitigen Beeinflussung der beiden genannten Hormone beim Vorgang der Glykoneogenese aus dl-Alanin untersucht. Bei diesen Versuchen wurde, wir wie erwähnten, das Percorten immer zu Beginn der Beatmung hinzugefügt, das Insulin teils in der beschriebenen Weise vorher mit den Schnitten in Verbindung gebracht, teils 5 min nach Beginn der Beatmung aus der dem Warburg-Gefäß anhängenden Birne ohne Unterbrechung der Atmung zugesetzt.

Bei den Versuchen, in denen erst Insulin vor der Beatmung mit den Schnitten in Verbindung gebracht wurde und bei Beginn der Atmung im Wasserbad Percorten zugesetzt wurde, erkennen wir, wie aus der Tabelle 6 hervorgeht, lediglich die Hemmung der Glykoneogenese durch das Insulin, während die fördernde Wirkung des Percorten nicht in Erscheinung tritt. In den Parallelversuchen hingegen, in denen Percorten bei Atmungsbeginn, Insulin aber erst 5 min später in die alaninhaltige Nährlösung gegeben wurde, kommt die Förderung durch Percorten meßbar zum Ausdruck, während die Hemmung, die wir durch das Insulin zu sehen gewohnt sind, nicht erkennbar wird.

Tabelle 4. *Glykogenaufbau in Leberschnitten von Ratten nach 24 Stunden Hunger. Substrat dl-Alanin 0,5%. Förderung des Glykogenaufbaues durch Desoxycorticosteronglykosid (Percorten) in verschiedener angegebener Konzentration in der Suspensionsflüssigkeit während der Atmung. Atmung 90 min bei 37° C. Glykogenwerte in mg pro 100 mg Lebergewebe.*

Versuch Nr.	Percorten γ/ml	Ausgangswert	Endwerte	
			Alanin	Alanin + Percorten
1.	25	0,150	0,210	0,380
2.	50	0,160	0,270	0,370
	100	0,160	0,270	0,470
3.	100	0,120	0,230	0,570
	200	0,120	0,230	0,420
	300	0,120	0,230	0,470
4.	100	0,150	0,310	0,460
5.	100	0,220	0,290	0,420
	200	0,220	0,290	0,440
	300	0,220	0,290	0,520
6.	100	0,150	0,280	0,410
7.	100	0,220	0,350	0,460
8.	100	0,080	0,200	0,300
9.	100	0,400	0,510	0,860
	50	0,400	0,510	0,660
10.	50	0,140	0,260	0,330
	100	0,140	0,260	0,580
11.	100	0,150	0,290	0,370
12.	200	0,130	0,270	0,520
13.	100	0,130	0,310	0,430
14.	100	0,080	0,190	0,350
15.	100	0,140	0,280	0,390
16.	100	0,200	0,300	0,540
Mittel:		0,174	0,288	0,465

Tabelle 5. *Glykogenbildung in Leberschnitten von Ratten nach 24 Stunden Hunger aus 0,5% dl-Alanin. Kolumne 3:100 γ/ml Percorten in der Suspensionslösung während der Atmung. Kolumnen 4 und 5: Schnitte vor der Atmung für eine (4) bzw. fünf (5) Minuten in percortenhaltiger (100 γ/ml) Lösung inkubiert, anschließend 5 min ausgewaschen. Medium der Kolumnen 4 und 5 während der Atmung ohne Percorten. Atmung 90 min bei 37°C. Glykogenwerte in mg pro 100 mg Lebergewebe.*

Ausgangswerte	Endwerte			
	Alanin	Alanin + Percorten „während"	Alanin + Percorten „vor" 1 min	Alanin + Percorten „vor" 5 min
0,140	0,280	0,390	0,210	0,240
0,080	0,190	0,350	0,230	0,190
0,200	0,310	0,540	0,300	0,300
Mittel 0,140	0,260	0,427	0,247	0,243

Tabelle 6. *Glykogenaufbau in Leberschnitten von Ratten nach 24 Stunden Hunger. 0,5% Alanin und 100 γ/ml Percorten in der Suspensionsflüssigkeit in allen Gefäßen. Kolumne 3: Insulin in angegebener Menge (Kolumne 4) 5 min nach Atmungsbeginn zur Suspensionsflüssigkeit zugesetzt. Kolumne 5: Schnitte vor Beginn der Atmung für 1 min in Insulinlösung (0,2 E/ml) inkubiert, anschließend 5 min ausgewaschen, kein Insulinzusatz zur Suspensionslösung im Atmungsgefäß. Atmung 90 min bei 37° C. Glykogenwerte in mg pro 100 mg Lebergewebe.*

Versuch Nr.	Ausgangswert	Endwerte			
		Alanin + Percorten	Alanin + Percorten + Insulin 5 min „nach"	Insulin E/ml	Alanin + Percorten + Insulin „vor" 0,2 E/ml
1.	0,180	0,350	0,370	0,2	0,190
	0,180	0,350	0,370	0,5	0,190
	0,180	0,350	0,370	1,0	0,190
2.	0,380	0,720	0,700	0,2	0,400
	0,380	0,720	0,560	1,0	0,400
3.	0,180	0,390	0,370	0,2	0,190
	0,180	0,390	0,330	1,0	0,190
4.	0,230	0,520	0,570	0,2	0,270
	0,230	0,520	0,500	1,0	0,270
5.	0,100	0,280	0,270	0,2	0,080
	0,100	0,280	0,310	0,5	0,080
6.	0,100	0,330	0,350	0,2	0,120
	0,100	0,330	0,310	0,5	0,120
7.	0,140	0,410	0,380	0,2	0,170
	0,140	0,410	0,410	0,5	0,170
Mittel:	0,191	0,423	0,411	—	0,202

Diskussion.

Glukosekonzentrationen von 0,1 bis 0,25% vermögen in Leberschnitten von Ratten nach 24stündigem Hunger bereits einen Glykogenansatz von fast 100% hervorzubringen, jedoch führen höhere Glukosemengen von 0,5 und 1,0% zu Glykogenwerten, die etwa 200% und mehr über dem Ausgangswert liegen. Grundsätzlich ist es nicht verwunderlich, daß eine ausgehungerte Leber, wie die einer Ratte nach 24 Std. Hunger, auch kleine Mengen Glukose an sich zieht und daraus Stärke aufbaut. Aber es scheint auch verständlich, daß erst höhere Glukosekonzentration durch das stärkere Gefälle (homöostatischer Lebermechanismus) zu stärkerem Glykogenansatz führt. Dann sind aber dem Stärkeaufbau wiederum Grenzen gesetzt. Wir müssen uns ja klar machen, daß es sich bei isolierten Organschnitten immer um sterbendes Gewebe handelt, dessen synthetische Fähigkeiten nicht mehr die des ganzen funktionstüchtigen Organs sein können, und überdies weitgehend von der Geschwindigkeit der Verarbeitung und möglichst schonendem Vorgehen dabei abhängig sind.

Wir erwähnten, daß von Ther[6] im Rattenzwerchfell bei Atmung in reinem Sauerstoff eine Hemmung des Glykogenaufbaus durch Strophanthin gesehen wurde, die in eine Förderung desselben Vorganges umschlug, sobald niedere Sauerstoffdrucke zur Beatmung benutzt wurden. Wir beobachteten nun, wie beschrieben, eine signifikante Verbesserung des Stärkeansatzes durch Strophanthin in reiner Sauerstoffatmung im Gegensatz zu dem geschilderten Verhalten im quergestreiften Muskel. Dabei müssen wir auch hier im Auge behalten, daß Leberschnitte geschädigtes Gewebe darstellen, das seine synthetischen Fähigkeiten überhaupt nur in reinem Sauerstoff zu entfalten vermag. So möchte man sich die Förderung des Aufbaues in beiden Fällen — im Zwerchfell und in der Leber — durch Verbesserung der assimilatorischen Funktion der Zelle erklären, die natürlich nur da in Erscheinung treten kann, wo eine Verbesserung dieser Fähigkeiten zur Synthese notwendig ist; im Muskel also unter Sauerstoffmangel, in der Leber unter der mechanischen Zellschädigung durch das Zerschneiden des Organs. Wie weit diese Verbesserung assimilatorischer Vorgänge am geschädigten Gewebe über die beobachteten Vorgänge hinaus auch für den Tätigkeitsstoffwechsel des Herzens Bedeutung hat, kann durch Versuche an isolierten Organteilen nicht geklärt werden. Auch die Frage, wie weit eine solche Wirkung andere Digitalisglykoside entfalten, bedürfte weiterer Untersuchungen.

Bei der Untersuchung der Glykoneogenese aus dl-Alanin und deren Beeinflussung durch Percorten und Insulin fällt das antagonistische Verhalten der beiden genannten Hormone auf. Während das erstgenannte den Umwandlungsvorgang fördert, wird er durch das letztgenannte gehemmt. Das Insulin wird, wie Stadie u. M. es für den Muskel nachwiesen, auch an die überlebende Leberzelle rasch und fest gebunden, während das Nebennierenrindenhormon auswaschbar und seine ständige Anwesenheit in der Nährlösung zur Entfaltung seiner Wirkung notwendig ist. Inwieweit diese verschiedene Haftfähigkeit der genannten Wirkstoffe mit der grundsätzlichen Verschiedenheit im Aufbau des Proteo- und des Stereo-Hormonmoleküls zusammenhängt, vermögen wir nicht zu sagen.

Bei der schließlich von uns gewählten Versuchsanordnung schaltet der Einfluß des zuerst gegebenen Hormons den des später hinzukommenden aus. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß beide Wirkstoffe ihren Angriffspunkt am gleichen Substrat auf dem Wege der Umwandlung von der Aminosäure zur Stärke besitzen können. Wir erwähnten, daß Bach u. Holmes erkannten, daß die Desaminierung der Aminosäuren durch das Insulin gehemmt würde. Im Anschluß daran möchten wir die Vermutung aussprechen, daß das Percorten an derselben Stelle fördernd eingreift. Nicht geklärt ist damit die Frage, warum das Insulin mit seiner viel festeren Haftung an der Zelle nicht das früher anwesende, aber doch

leicht auswaschbare Percorten zu verdrängen vermag. Nach den geschilderten Befunden hat das Desoxycorticosteronglukosid auch am isolierten Organ einen gewissen Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel.

Durch die zuletzt genannten Untersuchungen werden klinische Probleme berührt, die wir an dieser Stelle nur andeuten möchten, da Befunde am Leberschnitt der Ratte in vitro nur mit Vorbehalt Schlüsse auf Vorgänge in der menschlichen Leber im normalen Zusammenhang der Organe zulassen. Wir erwähnen nur die Hemmung der Glykoneogenese durch das Insulin, die wir uns bei der Behandlung der diabetischen Stoffwechseldekompensation zunutze machen, auf der anderen Seite die Versuche zur Leberglykogenanreicherung mit Percorten als Leberschutzbehandlung. Die gegenseitige Verdrängung der Hormone, die wir in vitro beobachten konnten, dürfte im Körper schwierigeren Regulationen unterworfen sein.

Zusammenfassung.

In Leberschnitten von Ratten wird der Glykogenaufbau und seine Beeinflussung studiert.

1. Glykogenaufbau aus Glukose erfolgt bereits bei Konzentrationen von 0,1% Glukose, jedoch werden mit höheren Traubenzuckermengen (0,5 und 1%) stärkere Glykogenansätze erzielt.

2. Strophanthin fördert den Glykogenansatz aus Glukose, während es gleichzeitig den Glykogenabbau in Leberschnitten normal ernährter Ratten vermindert.

3. Aus dl-Alanin wird Glykogen aufgebaut, Insulin hemmt, Desoxycorticosteronglukosid fördert diesen Vorgang.

4. Bei der Glykogensynthese aus dl-Alanuin kommt von den verwendeten Hormonen (Insulin und Percorten) nur dasjenige zur Wirkung, das als erstes auf den Leberschnitt einwirkt, während das später hinzukommende Hormon wirkungslos bleibt.

Literatur.

[1] Bach, S. J., und E. G. Holmes: Biochemic. J. **31**, 89 (1937). — [2] Cross, M. C. A., und E. Holmes: Brit. J. exper. Path. **18**, 370 (1937). — [3] Ostern, P., J. Herbert u. E. G. Holmes: Biochemic. J. **33**, 1858 (1939). — [4] Kun, E.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **68**, 496 (1948). — [5] Tuerkischer, E., u. E. Wertheimer: Biochemic. J. **42**, 603 (1948). — [6] Ther, L.: Habilitationsschrift. Frankfurt 1949. — [7] Chiu, C. Y., u. D. M. Needham: Nature (Lond.) **164**, 790 (1949). — [8] Voigt, R.: Hoppe-Seylers Z. **281**, 1 (1944). — [9] Buchanan, J. M., A. B. Hastings u. F. B. Nesbett: J. of biol. Chem. **145**, 715 (1942). — [10] Warburg, O.: Biochem. Z. **142**, 317 (1923). — [11] Good, C. A., H. Kramer u. M. Somogyi: J. of biol. Chem. **100**, 485 (1933). — [12] Sahyun, M.: J. of biol. Chem. **103**, 203 (1933). — [13] Hagedorn u. Jensen: Biochem. Z. **135**, 46 (1923). — [14] Stadie, W. C., N. Haugaard, J. B. Marsh u. A. G. Hills: Amer. J. med. Soc. **218**, 265 u. 275 (1949).

Dr. Wulf Lübken, Greifswald, Medizinische Universitätsklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 262—265 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler).

Die stoffwechselsteigernde Wirkung des Noradrenalins.

Von
G. Bauer und F. Lembeck.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 24. September 1951.)

Bei der Untersuchung von Stoffwechselwirkungen des Noradrenalins lagen sehr bald eindeutige Angaben über die blutzuckersteigernde Wirkung vor[1,2,3]. Hingegen sind die inzwischen mitgeteilten Untersuchungen der grundumsatzsteigernden Wirkung des Noradrenalins nicht übereinstimmend. Diese Tatsache veranlaßt uns zur Veröffentlichung der vorliegenden (bereits im Mai 1950 abgeschlossenen) Untersuchung, besonders im Hinblick auf die gelegentlich bei Phaeochromocytomen mit ihrem hohen Noradrenalingehalt[4] beobachtete hohe Grundumsatzsteigerung.

Die hyperglykämische Wirkung des l-Noradrenalins wird zu 5%[1] bis 12%[3] der Wirkung des l-Adrenalins, diejenige des d-Noradrenalins mit 0,6% des l-Adrenalins[3] angegeben.

Die Grundumsatzsteigerung durch Noradrenalin wurde zuerst von Thibault[5] untersucht; er fand, daß an Ratten 2 mg Noradrenalin/kg (l-Noradrenalin oder Racemat?) ebenso wie 0,75 mg Adrenalin/kg eine 65—85%ige Steigerung hervorrufen. Lundholm[6] untersuchte die Stoffwechselsteigerung am Meerschweinchen und fand, daß l-Noradrenalin etwa ein Fünftel der Wirkung des Adrenalins hat. Das Maximum wurde bei 20 μg/kg l-Noradrenalin nach 40 min erreicht, während die Wirkung bei 100 μg/kg über 70 min hinaus fortdauerte. Untersuchungen von Holtz[7] am Menschen zeigten, daß beim Vergleich der Wirkung von 1 mg l-Adrenalin mit 1 mg d-l-Noradrenalin (also 0,5 mg l-Noradrenalin) das letztere nach 30 min etwa 20%, nach 60 min etwa 70% der Wirkung von 1 mg l-Adrenalin hat, wobei der Effekt beim Noradrenalin etwas schneller abklingt als beim Adrenalin. Deshalb scheint es eigentlich nicht ganz sinngemäß, die Stoffwechselsteigerung des Noradrenalins als geringer zu interpretieren. Issekutz[8] untersuchte die Stoffwechselsteigerung an Ratten und fand nach 100 μg dl-Noradrenalin/100 g 40—130%ige, nach 160 μg dl-Noradrenalin/100 g 40—140%ige und nach 200 μg dl-Noradrenalin/100 g 28—80%ige Grundumsatzsteigerungen, während nach 50 μg l-Adrenalin/100 g eine Erhöhung um durchschnittlich 47,5%, somit eine ungefähr gleiche Wirkung beider Substanzen beobachtet wurde.

Aus den genannten Arbeiten ergibt sich kein einheitliches Bild, was nicht zuletzt damit zusammenhängen mag, daß die Untersuchungen einerseits am Menschen, andererseits an Ratten oder Meerschweinchen ausgeführt wurden. Unsere Versuche geben vor allem einen genaueren Einblick in den zeitlichen Verlauf der Stoffwechselsteigerung.

Methodik.

Die Versuche wurden in der Stoffwechselapparatur für Kleintiere nach Häusler[9] mit dem verbesserten Ventil[10] an männlichen Albinoratten ausgeführt, die mit fleischfreiem Mischfutter und Wasser ad libitum ernährt wurden. Die Tiere wurden jeden 4. bis 6. Tag zum Versuch verwendet, nachdem ihnen 16 Std vorher die Nahrung entzogen worden war. Die Versuchstemperatur betrug 20° C. Die Spirometer der Stoffwechselapparatur wurden vor und nach jedem Versuch geeicht. Als Atemgas wurde Co_2-freier Sauerstoff verwendet. Sauerstoffverbrauch und Wiederauffüllung der Spirometer wurden auf einem Rußkymographion registriert. In dem Stoffwechselbehälter wurde jeweils eine Gruppe zu 5 Tieren eingesetzt, welche wie in einem Kreuztest abwechselnd zu Adrenalin- und Noradrenalinversuchen verwendet wurde.

Die erste Viertelstunde nach dem jeweiligen Einsetzen der Ratten in den Tierbehälter wurde nicht berücksichtigt, um die Anpassung an das veränderte Milieu und vor allem an die Temperatur des Wasserbades zu gewährleisten. Zunächst wurde mit den unbehandelten Tieren 1 Std lang der O_2-Verbrauch registriert. Hierauf wurden die Tiere herausgenommen und unmittelbar nach der unter die Rückenhaut erfolgten Injektion von Adrenalin bzw. Noradrenalin wieder in den Tierbehälter gesetzt. Auch jetzt wurde der Wert der ersten Viertelstunde nach der Injektion wegen der erneuten Anpassung verworfen, die Versuchsdauer nach der Injektion betrug 3 Std.

Die zur Injektion verwendeten Mengen Adrenalin bzw. Noradrenalin wurden mit 0,9% Kochsalzlösung so verdünnt, daß die gewünschte Menge in 0,3 ml Flüssigkeit gegeben werden konnte, was hinsichtlich der Resorptionsgeschwindigkeit von Bedeutung ist. 0,3 ml NaCl-Lösung war, wie vorhergehende Kontrollversuche ergaben, ohne Wirkung auf den Stoffwechsel. Die Menge des injizierten Adrenalins bzw. Noradrenalins wird im Folgenden, bezogen auf freie Base, angegeben. Zu den Versuchen stand l-Noradrenalinbitartrat und l-Adrenalinbitartrat der Fa. *Sanabo* zur Verfügung*.

Resultate.

Die gewonnenen Ergebnisse sind in der Abbildung mit Einzeichnung des mittleren Fehlers der Einzelbeobachtung graphisch dargestellt. Es geht daraus hervor, daß das Maximum der Grundumsatzerhöhung bei Adrenalin und Noradrenalin annähernd gleich ist. Ein deutlich zu erkennender Unterschied besteht aber darin, daß der maximale Wert beim Noradrenalin regelmäßig bereits zwischen 30 und 45 min nach der Injektion erreicht wird, während das Maximum der Adrenalinwirkung ebenso regelmäßig erst zwischen 90 und 105 min nach der Injektion zu beobachten ist. Erwähnenswert ist vielleicht die Tatsache, daß trotz gelegentlich größerer Streuungen der Grundumsatzwerte vor der Injektion die im Gebiete des Stoffwechselmaximums auftretenden Streuungswerte außerordentlich gering werden, wie das besonders deutlich nach 30 μg Adrenalin oder 30 μg Noradrenalin pro 100 g Tier in der Abbildung zu sehen ist. Ob das grundsätzlich von Bedeutung ist bzw. unsere Vorstellungen über diese Beobachtung begründet sind, sollen weitere, besonders daraufhin gerichtete Versuche zeigen.

* Für die Überlassung dieser Substanzen sei der Fa. Sanabo, Wien, der Dank ausgesprochen.

Diskussion.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß die Grundumsatzsteigerung nach Noradrenalin im Gegensatz zu seiner blutzuckersteigernden Wirkung verhältnismäßig groß ist. Die Erhöhung in der ersten Stunde ist im großen und ganzen derjenigen des Adrenalins gleich, doch tritt das Maximum wesentlich früher ein, wogegen die Wirkung

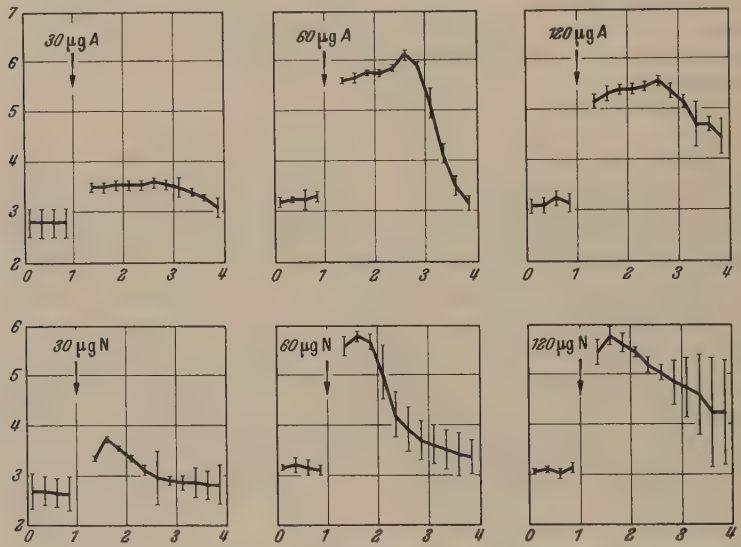


Abb. 1. Grundumsatz nach Injektion von Adrenalin (A) und Noradrenalin (N) pro 100 g Tiergewicht, Ordinate: Verbrauch an Kubikzentimetern O_2/min/100 g Tier, Abszisse: Zeit in Stunden.

rascher abklingt. Dementsprechend fanden wir auch in hier nicht erwähnten Vorversuchen, bei denen nur der Gesamt-O_2-Verbrauch durch eine längere Zeit gemessen wurde, eine schwächere Wirkung des Noradrenalins.

Die kürzere Wirkungsdauer des Noradrenalins, welche u. a. auch dann zutage tritt, wenn es als Zusatz zur Verlängerung der Wirkung eines Lokalanästhetikums verwendet wird[11], hängt möglicherweise mit der in letzter Zeit von Burn[12] über den Abbau des Noradrenalins geäußerten Ansicht zusammen; er weist darauf hin, daß nach Denervierung eines Organes die Empfindlichkeit gegenüber Noradrenalin wesentlich mehr ansteigt als gegenüber Adrenalin, und führt dies auf ein Enzymsystem zurück, welches normalerweise Noradrenalin viel schneller abbaut als Adrenalin, nach Denervierung jedoch ähnlich wie die Cholinesterase abnimmt. Ebenso wie die Funktion dieses, speziell auf Noradrenalin eingestellten Enzymsystems bei den meisten biologischen Objekten lediglich in einer — amplitudenmäßig gesehen — schwächeren Reaktion auf experimentell zugeführtes Noradrenalin zum Ausdruck kommt, könnte man in unseren Ergebnissen bezüglich der Wirkungsdauer gewissermaßen eine Bestätigung der Burnschen Ansicht erblicken, daß die Wirkung des Noradrenalins durch einen wirksameren Angriff abbauender Enzyme von kürzerer Dauer ist.

Zusammenfassung.

1. Die grundumsatzsteigernde Wirkung von Noradrenalin und Adrenalin wurde an Ratten mit der Stoffwechselapparatur nach HÄUSLER untersucht.

2. Nach subcutaner Injektion von 30, 60 und 120 μg/100 g Noradrenalin steigt der Stoffwechsel zunächst auf die gleiche Höhe wie nach der entsprechenden Dosis Adrenalin. Das Maximum der Noradrenalinwirkung wird nach 30—45 min erreicht und klingt bald wieder ab, während die Adrenalinwirkung ihr Maximum zwischen 90 und 105 min erreicht und länger vorhält.

Literatur.

[1] SCHÜMANN, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 164 u. 475 (1949). — [2] HOLTZ, P., u. H. J. SCHÜMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 484 (1949). — [3] MCCHESNEY, E. W., MCAUCLIFF, I. B., and H. BLUMBERG: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **71**, 220 (1949). — [4] HOLTON, B.: J. of Physiol. **108**, 525 (1949). — [5] THIBAULT, O.: C. r. Soc. Biol. Paris **142**, 47 (1948). — [6] LUNDHOLM, L.: Acta Physiol. Scand. **18**, 341 (1949). — [7] HOLTZ, P.: Pharmazie **5**, 49 (1950). — [8] ISSEKUTZ, P., I. LICHTNECKERT, G. HETENYI et M. BEDÖ: Arch. internat. Pharmacodynamie **84**, 376 (1950). — [9] HÄUSLER, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 345 (1936). — [10] HÄUSLER, H. F., u. F. LEX: Arch. exper. Path. u. Pharmakol., **214**. 211 (1952). — [11] LEMBECK, F., u. H. STERZ: Wien. klin. Wschr. **63**, 816 (1951). — [12] BURN, J. H.: Physiologic. Rev. **30**, 177 (1950).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 266—268 (1952).

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg.

Über die Veränderlichkeit der Oberflächenspannung in den Alveolen und ihre Bedeutung für die Retraktionskraft der Lunge.

Von

H. v. Hayek.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 28. September 1951.)

Den Anlaß zu dieser Untersuchung gaben Beobachtungen, daß die durch Fixierung gewonnene eiweißhaltige Flüssigkeit, die bei Lungenödem in den Alveolen gefunden wird, verschiedengeformte Grenzflächen gegen die noch in den Alveolen befindliche Luft zeigen kann. In einem Teil der Präparate sind diese Grenzflächen kugelschalenartig parallel den Alveolenwänden angeordnet, so daß jede Alveolenwand von einer dicken Flüssigkeitsschicht bedeckt ist, so wie auch bei Celloidineinbettung ähnliche Bilder entstehen. Andererseits können sich diese Grenzflächen bei in Rückenlage in situ fixierter Lunge in horizontalen Niveauflächen einstellen, wie das Abb. 1 zeigt. Da eine derartige Verformung der Flächen durch Einfluß des Fixierungsmittels oder der Wasserentziehung durch Alkohol ausgeschlossen erscheint, kommt für die Entstehung der verschiedenen Formen der Grenzflächen nur die Verschiedenheit der Oberflächenspannung in Frage. Daß die die Alveolen benetzende Flüssigkeit eine variable Zusammensetzung besitzt und von der biochemischen Tätigkeit der Alveolarwandzellen abhängt, betont schon Policard im Zusammenhang mit der Bedeutung dieser Flüssigkeit für den Gasdurchtritt. Ich habe nun kürzlich (1951) an den Alveolarepithelzellen Zustandsbilder gezeigt, die auf verschiedene Sekretionsvorgänge und einen intensiven Eiweißstoffwechsel schließen lassen. Die Verschiedenheit der Ödemflüssigkeit in den anfangs besprochenen Fällen mit ihrer verschiedenen Oberflächenspannung dürfte daher unter anderem von der Tätigkeit der Alveolarepithelzellen abhängen.

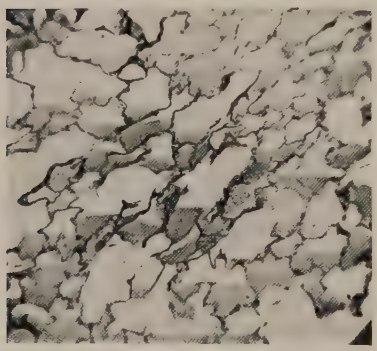


Abb. 1. Begrenzung der Ödemflüssigkeit in horizontalen Niveauflächen in den Alveolen. 25 f.

Daß die Oberflächenspannung in den Alveolen auch einen Einfluß auf die Retraktionskraft der ganzen Lunge besitzt, hat schon v. Neergard beschrieben. Er führte Elastizitätsmessungen bei Dehnung der Lunge durch und kommt zu dem Schluß, daß nur $^1/_3$—$^1/_4$ der Gesamtretraktionskraft auf der Gewebselastizität beruht, der größere Teil dagegen auf der Oberflächenspannung. Er berücksichtigt dabei auch die Veränderlichkeit der Größe der Alveolareingangsringe. Wenn auch seinen Berechnungen zum Teil die Grundlage fehlt, weil die Alveolen vielfach polygonal und nicht kugelförmig sind (Abbildungen bei v. Hayek 1945), so muß doch daran festgehalten werden, daß die Oberflächenspannung für die Retraktionskraft der Lunge eine wesentliche Rolle spielt. Kilches hat die Oberflächenspannung ausgeschaltet, indem er Säugetierlungen vollständig mit Flüssigkeit gefüllt hat und festgestellt, daß sich die Lungen dennoch bis zur Kollapslage retrahierten; er kommt zu dem Schluß, daß die elastischen Kräfte der Lunge im Verhältnis zur Oberflächenspannung größer sind, als v. Neergard das annimmt.

Eine Änderung der Oberflächenspannung in den Alveolen und damit der Retraktionskraft erfolgt nach v. Neergard durch Schwankungen der H-Ionenkonzentration bei verschiedener CO_2-Spannung in dem Sinne, daß eine höhere CO_2-Spannung die Oberflächenspannung herabsetzt. Wick (1951a) hat nun eine reversible Vergrößerung des Lungenvolumens durch Kohlensäure auf das Fünffache beobachtet und führt diese Vergrößerung (1951b) auf die Verringerung der Oberflächenspannung zurück.

Um nun festzustellen, welchen Einfluß eine Auskleidung der Alveolen mit Flüssigkeit verschiedener Oberflächenspannung auf die Retraktionskraft der Lungen besitzt, habe ich an 10 Meerschweinchen Versuche mit Tannin und gallensaurem Natrium, also mit Lösungen, deren hohe bzw. niedrige Oberflächenspannung bekannt ist, durchgeführt. Die Tiere wurden mit Urethan (1 g pro kg) narkotisiert und außerdem wurde zur Lähmung der Lungenmuskulatur Atropin gegeben. Nach Entblutung der Tiere wurden die Lungen einem starken negativen Druck ausgesetzt, während die offene Trachea in Lösung mit 1% Tannin oder gallensaurem Natrium hineinragte. Nach Wiedereinwirkung atmosphärischen Druckes war dann die Lunge praktisch luftleer und hatte eine geringe Menge der Lösung aufgenommen. Dann wurde noch 1 cm^3 Lösung in die Trachea eingespritzt, wobei der Überschuß ausfließen konnte, damit bei der nachfolgenden Blähung der Lunge mit 2 cm^3 Luft genügend Lösung in der Lunge war, um alle Alveolen zu benetzen. Um vergleichbare Verhältnisse zu schaffen, wurde immer zugleich von gleichgroßen Tieren eine Lunge mit Tannin und eine andere mit gallensaurem Natrium benetzt.

Es zeigte sich, daß bei den mit Tannin behandelten Lungen die Luft, die bis in die Alveolen vorgedrungen war, sofort wieder herausgeblasen wurde, wenn die Spritze entfernt war, während bei den mit gallensaurem Natrium behandelten Lungen die Luft in den Alveolen blieb. Die ersteren Lungen waren dann wieder klein und fleischfarben, während die letzteren voluminös die helle Farbe lufthaltigen Gewebes zeigten. Nur zwei von den 10 Lungen, die entzündliche Erscheinungen (auch Eiter in den Bronchi) aufwiesen, zeigten ein abweichendes Verhalten. Daß eine

gerbende oder fixierende Wirkung des Tannins für den beobachteten Effekt nicht in Frage kommt, war daraus zu schließen, daß bei Füllung der Lunge mit 2 cm^3 Tanninlösung an Stelle von Luft die Retraktion der Lunge nicht in der gleichen Weise erfolgte.

Aus diesen Beobachtungen muß geschlossen werden, daß eine Lunge mit tannin-benetzten Alveolen eine größere Retraktionskraft besitzt als eine Lunge, deren Alveolen mit gallensaurem Natrium benetzt waren; ein Unterschied der Retraktionskraft, der auf die verschiedene Oberflächenspannung an der Grenzfläche Luft - Lösung zurückzuführen sein muß.

Nachdem die geschilderten Beobachtungen zeigten, daß erstens in der menschlichen Lunge in den Alveolen Flüssigkeit von verschiedener Oberflächenspannung gefunden werden kann, und daß zweitens Flüssigkeit von verschiedener Oberflächenspannung in den Alveolen beim Versuchstier eine verschiedene Retraktionskraft der Lunge bedingte, darf geschlossen werden, daß auch in der menschlichen Lunge verschiedenartige Flüssigkeit in den Alveolen eine verschiedene Retraktionskraft der menschlichen Lunge bedingen kann.

Es besteht somit die Möglichkeit, daß die geringe Retraktionskraft von Emphysemlungen mit einer abnorm geringen Oberflächenspannung der Alveolarflüssigkeit zusammenhängt. Untersuchungen über die Oberflächenspannung der normaler- und pathologischerweise die Alveolen benetzenden Flüssigkeit dürften bisher nicht durchgeführt worden sein.

Zusammenfassung.

Aus der Beobachtung verschieden geformter Oberflächen der geronnenen Ödemflüssigkeit in menschlichen Lungen wird auf eine verschiedene Oberflächenspannung der Flüssigkeit in diesen Fällen geschlossen.

Versuche mit Lösungen von Tannin bzw. gallensaurem Natrium als Lösungen extrem verschiedener Oberflächenspannung zeigen, daß die mit diesen Flüssigkeiten benetzten luftgefüllten Alveolen und damit die ganzen Lungen eine verschiedene Retraktionskraft besitzen.

Es wird daraus geschlossen, daß verschiedene Oberflächenspannung der die Alveolen benetzenden Flüssigkeit in den menschlichen Lungen eine verschiedene Retraktionskraft der Lunge bewirken kann, und daß sich Beziehungen zur Entstehung des Emphysems ergeben können.

Literatur.

v. Hayek, H.: Erg. Anat. **34**, 144 (1945). — Verh. anat. Ges. **49** (1951). — Kilches, R.: Klin. Wschr. **19**, 695 (1940). — v. Neergard, K.: Z. exper. Med. **66**, 371 (1929). — Policard, A.: Le Poumon. Paris 1938. — Wick, H.: Arch. internat. Pharmacodynamie **51** (1951).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 269—271 (1952).

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg.

Über flimmertragendes und sezernierendes Bronchialepithel und die Einwirkung von Aludrin.

Von

H. v. Hayek.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. September 1951.)

Die Tatsache, daß nicht nur die Bronchialdrüsen, sondern auch das Oberflächenepithel der Bronchi und Bronchioli eine Sekretionstätigkeit zeigen können, wurde bisher wenig beachtet. Als erster hat meines Wissens Clara beschrieben, daß beim Menschen wie beim Kaninchen in den Bronchioli neben Flimmerzellen auch Zellen mit keulen- oder lappenförmigen Fortsätzen vorkommen, die er als apokrin sezernierende Zellen anspricht und ihre Entstehung aus Flimmerzellen geschildert.

Daß aus Flimmerzellen überhaupt sezernierende Elemente entstehen können, beobachtete Schaffer (1908) am Eileiter. Bei der Maus konnte ich (1943, 1945) dann beobachten, daß solche Zellen mit keulenförmigen Fortsätzen nach Einwirkung hoher Adrenalindosen, die Lungenödem erzeugen, in besonders großer Zahl vorhanden sind, Zellen, die Macklin (1949) auch bei unbehandelten Mäusen in geringerer Zahl findet. Beim Menschen schließlich finde ich (1951) gelegentlich in den Bronchioli einen eigenartigen Sekretionsvorgang, bei welchem Vacuolen, d. h. Tröpfchen einer nicht färbbaren Substanz, in den Epithelzellen nahe dem Kern entstehen, die nach der Oberfläche der Zelle wandern und dann dort in Form einer dünnwandigen Blase gegen die Lichtung vorragen, wo es dann offenbar durch Platzen der Vacuole zur Ausstoßung des Inhalts kommt; ein Bild, das der Sekretion der Hauptstücke der Nierenkanälchen (Schaffer 1933) ähnelt. Da meine Präparate anders fixiert waren als die Claras, kann ich nicht mit Sicherheit entscheiden, ob die von mir beobachteten Vacuolen den Tröpfchen in den keulenförmigen Fortsätzen entsprechen, die Clara beschreibt. Es scheint jedoch wahrscheinlich, daß es sich um denselben Vorgang handelt, der je nach der Fixierung verschiedene Bilder liefert. Die aus den Zellen in die Lichtung ausgestoßenen Tröpfchen färben sich mit Eosin rot; ein Verhalten, das deswegen von besonderem Interesse ist, weil bei Asthma (Riva und Probst) außer Schleim auch mit Eosin anfärbbares Sekret gefunden wird. Die Tatsache, daß dieser „Schleim" auch in den keine Drüsen mehr tragenden Bronchioli vorkommt, gab Anlaß zu der Annahme, daß dieser „Schleim" in die Bronchioli aspiriert worden sei. Die eben geschilderten Befunde einer Sekretion des Oberflächenepithels der Bronchioli scheinen dafür zu sprechen, daß der bei Asthma in ihnen gefundene „Schleim" von dieser Sekretion der Bronchiolusepithelien stammt.

Nachdem nun einerseits Adrenalin in hohen Dosen den Zustand der Bronchiolenepithelien beeinflußt und andererseits Aludrin, ein Verwandter des Adrenalins, sich bei Asthma als erfolgreiches Medikament

erwiesen hat, schien es von Interesse, zu untersuchen, ob Aludrin einen Einfluß auf die Epithelien der Bronchiolen besitzt.

Als Versuchstiere dienten 10 Meerschweinchen, von denen 3 als Kontrolle ohne Aludrineinwirkung blieben, während die übrigen in einem geschlossenen, etwa 5 Liter fassenden Gefäß 10 min zerstäubte Aludrinlösung geatmet hatten. Es wurden 50—100 cm^3 0,1—0,3%iger Aludrinlösung versprüht. Die ersten Tiere wurden durch Nackenschlag getötet, die letzten tief mit Numal narkotisiert, bei allen der Thorax eröffnet und nach kurzer Durchspülung mit wenigen Kubikzenti-

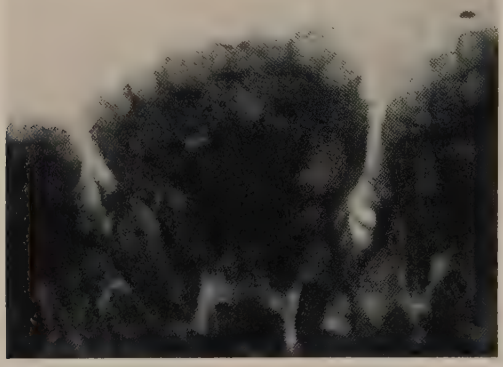


Abb. 1. Schleimhautepithel eines Bronchus vom Meerschweinchen. Kontrolltier mit Numalnarkose. 1000fach.

metern physiologischer Kochsalzlösung vom Herzen aus die Fixierung der Lunge mit 5%iger Formalinlösung durchgeführt.

Als prinzipiell gleiches Resultat ergab sich bei allen Tieren, die Aludrin geatmet hatten, in den kleinsten knorpeltragenden Bronchi eine stärkere Ausbildung der Flimmerzellen und demgemäß eine geringere Zahl von sezernierenden Zellen als bei den Kontrolltieren.

Besonders auffallend ist der Unterschied zwischen Kontroll- und aludrinbehandelten Tieren nach Numalnarkose. So zeigt die Abb. 1 eine Schleimhautfalte von einem Kontrolltier, an deren Kuppe nur Zellen mit vorragenden Bläschen oder Vacuolen zu sehen sind, in den Furchen zwischen den Falten dagegen Flimmerzellen. Abb. 2 von einem mit Aludrin behandelten Tier dagegen läßt zwischen den vielen Flimmerzellen zweier Schleimhautfalten nur eine Vacuole erkennen. Die durch Nackenschlag getöteten Tiere ergaben weniger schöne Bilder, da diese Lungen immer ein mehr oder weniger stark ausgebildetes Ödem aufweisen.

Die Beobachtung, daß Aludrin das Verhältnis von Flimmerzellen zu sezernierenden Zellen im Sinne eines Überwiegens der Flimmerzellen beeinflußt, läßt vermuten, daß es zur Umwandlung von sezernierenden Zellen in Flimmerzellen kommt; auch Clara schließt aus seinen

Beobachtungen an Kaninchen, die mit Trypanblau gespeichert worden waren, daß eine Umwandlung von Flimmerzellen in sezernierende Zellen, und auch umgekehrt, vorkommt.

Eine gewisse Parallele zu dieser Beobachtung ergibt eine Untersuchung von Graubner und Wick, die feststellten, daß Aludrin 1 : 1000 eine Beschleunigung des Flimmerstromes beim Frosch erzeugt, während eine höhere Konzentration sowie Adrenalin den Flimmerstrom verlangsamt. Ob allerdings dort auch eine Umwandlung der beiden Zellarten ineinander erfolgen kann, ist nicht bekannt.

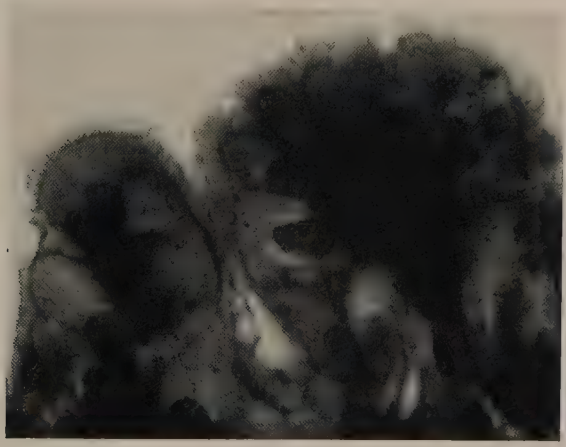


Abb. 2. Wie Abb. 1. Aludrin-Inhalation und Numalnarkose.

Bisher konnte nicht festgestellt werden, wie etwa verschiedene Konzentrationen von Aludrin oder verschiedene Einwirkungsdauer auf die Bronchialepithelien einwirken, und ob auch andere Stoffe einen Einfluß auf die Wandelbarkeit der Epithelien besitzen. Im Hinblick auf das Asthma scheinen jedoch schon diese Beobachtungen von Wichtigkeit.

Literatur

Clara, M.: Z. mikrosk.-anat. Forschg **41**, 321 (1937). — Graubner, W., et H. Wick: Arch. internat. Pharmacodynamie **84**, 337 (1950). — v. Hayek, H.: Klin. Wschr. **22**, 637 (1943). — Erg. Anat. **34**, 144 (1945). — Verh. anat. Ges. **49** (1951). — Macklin, Ch. C.: Canad. Journ. of Research **27**, 50 (1949). — Riva, G., u. R. Probst: Schweiz. med. Wschr. **80**, 1325 (1950). — Schaffer, J.: Mschr. Geburtsh. **28**, 526 (1908). — Lehrbuch d. Histologie, 3. Aufl. 1933, S. 424.

Prof. Dr. H. v. Hayek, Wien 9, Währingerstraße 13,
Anatomisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 272—279 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Der Einfluß einer Hitzebehandlung roter Blutkörperchen auf die Silberwirkung.

Von

HERBERT REMMER und ELEONORE SEILER.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. August 1951.)

Rote Blutkörperchen werden bereits durch geringe Mengen von Silber lysiert. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Vorgang sich vollzieht, steht in enger Beziehung zu den in der Lösung vorhandenen Silber-Ionen[1]. Die hämolytische Grenzkonzentration der Silbersalze wird durch Substanzen heraufgesetzt, die Silber komplex zu binden vermögen. Zu diesen Verbindungen gehören die Alkalichloride in höheren Konzentrationen sowie die Proteine. Nach den Untersuchungen von v. NEERGARD ist die Affinität der Eiweiße für Silber sehr verschieden; Albumin bindet mehr als Globulin[2].

Diese Bindungstendenz des Silbers wird wahrscheinlich bei der Hämolyse von Bedeutung sein. Mit welchen Strukturen der roten Blutkörperchen das Silber Bindungen eingeht, ist nicht bekannt. Da die üblichen Untersuchungsmethoden nicht weiter führten, wurde ein etwas ungewöhnlicher Weg beschritten, um näheren Einblick zu erlangen.

Durch vorsichtiges Erwärmen auf genau 49°, wobei noch keine Hämolyse zu bemerken ist, treten charakteristische Veränderungen an den roten Blutzellen auf[3, 4, 5], deren Ursache wahrscheinlich in einer spezifischen Strukturwandlung der Zellmembran zu suchen ist.

Die Vermutung lag nahe, daß die Störung, welche durch die Wärme hervorgerufen wird, auch die Wirkung des Silbers auf die Erythrocyten beeinflußt. Deshalb wurde dieser Test benutzt, um den Angriffspunkt des Silbers näher zu fassen.

Methodik.

Frische Menschen- oder Pferdeblutkörperchen wurden mit 1,3%iger Natriumnitratlösung 3mal gewaschen und mit der gleichen Lösung auf 1 : 25 verdünnt. Um Störungen durch die unphysiologischen Ionen möglichst zu vermeiden, wurden die Versuche mit dem gleichen Blute meist noch am selben Tage beendet. Die Hämoglobinkonzentration bestimmten wir nach der Hämiglobincyanid-Methode von HAVEMANN[6]. Eine bestimmte Menge dieser Erythrocytensuspension wurde im HÖPPLER-Thermostaten auf die gewünschte Temperatur erhitzt. Wenn diese in den Suspensionen erreicht war, blieben die Erythrocyten noch genau 2 min im Wärmebad. Nach der Herausnahme ließen wir sie auf Zimmertemperatur

abkühlen. Wir benutzten stets dünnwandige Reagensgläser, die den gleichen Durchmesser hatten, um die Gewähr zu haben, daß die Erwärmung bis zu einer festgesetzten Temperatur etwa die gleiche Zeit beansprucht.

Den Hämolysegrad der behandelten und unbehandelten Suspensionen ermittelten wir nach Zentrifugieren (5 min bei 2000 Umdrehungen pro Minute) in der überstehenden Flüssigkeit im HAVEMANN-Colorimeter mit der gelben Hg-Linie.

Die osmotische Resistenz untersuchten wir in der üblichen Weise. 1 cm^3 der Erythrocytensuspension setzten wir 9 cm^3 einer Natriumnitratlösung bestimmter osmotischer Konzentration zu. Die isotonische Konzentration wird in den Versuchen mit 1 bezeichnet.

Zur potentiometrischen Bestimmung wurden jeweils 6 cm^3 der Erythrocytensuspension in 150 cm^3 einer 1,3%igen Natriumnitratlösung aufgeschwemmt. Der Hämoglobingehalt dieser verdünnten Suspension wurde nochmals ermittelt und die Zahl der Blutkörperchen festgestellt. Der Verlauf der Reaktion zwischen dem Silber und bestimmten komplexbildenden Substanzen der Blutkörperchen wurde jeweils in 125 cm^3 der beschriebenen Suspension verfolgt. Eine exakte Bestimmung des gebundenen Silbers war in diesem Versuche nicht möglich. Denn das Potential der Silberelektrode, welche in die Suspension tauchte, wurde durch Erythrocyten und Hämoglobin etwas gestört. Außerdem waren scharfe Knickpunkte der Titrationskurve nicht zu erwarten, da das Silber komplexe Bindungen eingeht. Deshalb beschränkten sich die Untersuchungen auf die Feststellung der ungefähren Menge an zugefügtem Silbernitrat, bei welcher auffallende Änderungen im Kurvenverlauf auftraten.

Zur Messung des Potentials lehnten wir uns an eine Methode von E. MÜLLER[7] an. Aus einer Bürette ließen wir die Silbernitratlösung unter gleichmäßigem Rühren eintropfen. Zwei sorgfältig gereinigte Silberdrähte bildeten die beiden Elektroden, von denen die *eine* in die Suspension tauchte, während die *andere* in eine feine Capillare mit einer lichten Weite von 1 mm hineinragte. Diese war in allen Versuchen mit 10^{-3} molarer Silbernitratlösung gefüllt und tauchte ebenfalls in die zu messende Suspension. Die Spannung wurde mit einem Potentiometer bestimmt; als Null-Instrument diente ein hochempfindliches Multiflex-Galvanometer (MG 4). Die Anordnung entsprach derjenigen einer gebremsten Elektrode, weil die Volumina, in welche die beiden Drähte eintauchten, sich wie 1 : 5000 verhielten. Der Vorteil besteht darin, daß eine Normal-Elektrode gespart wird. Selbst wenn 40% der Ionen aus der Capillare in die Erythrocytensuspension diffundieren sollten, würde die gleiche Menge einfließen, die durch einen Tropfen einer 2×10^{-4} molaren Lösung der Flüssigkeit hinzugefügt wird. Daher braucht dieser Fehler nicht berücksichtigt zu werden. Solche gebremsten Elektroden sind nur dann zu verwenden, wenn auf absolute Potentialwerte verzichtet wird und die Bestimmung eines Potentialsprunges ausreichend ist.

Ergebnis.

Wird Silbernitrat in kleinen Mengen einer Erythrocytensuspension zugesetzt, so bleibt das Potential fast auf gleicher Höhe (Abb. 1). Dieses Verhalten beweist, daß die Silber-Ionen aus der Lösung verschwinden. Nach 30 min, wenn die Silbernitratmenge, auf einen Erythrocyten berechnet, 1×10^{-16} Mol erreicht hat, sinkt das Potential nach jedem Zusatz von Silber allmählich ab, ein Zeichen dafür, daß nun Silber-Ionen in Lösung bleiben und die Bindung des Silbers abgeschlossen ist. Bei $1{,}7 \times 10^{-16}$ Mol $AgNO_3$/Ery., einer Menge, die in diesem Versuch

nach 50 min erreicht wurde, beginnt das Potential plötzlich wieder anzusteigen. Erst nach Anreicherung von Silber-Ionen setzt eine zweite Reaktion ein, die in kurzer Zeit die vorhandenen Ionen verbraucht.

Dieses auffällige Verhalten ließ sich unter verschiedenen Versuchsbedingungen reproduzieren. Der Beginn des Potentialanstieges war dabei abhängig von der zugesetzten Silbermenge. Er wurde bei einer

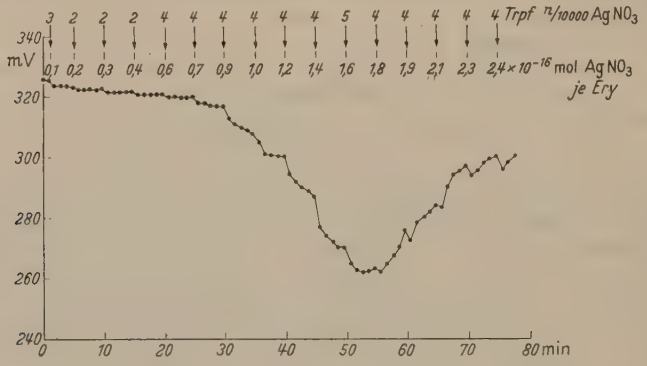


Abb. 1. Pferdeerythrocytensuspension (1 Tag alt) in physiologischer $NaNO_3$-Lösung ($0{,}9 \times 10^9$ Ery. in 125,0 cm³). Potentialmessung Ag^+/Ag, Vergleichselektrode 10^{-3} n Ag^+/Ag. In Abständen von 5 min wurden 2—5 Tropfen hinzugefügt und das Potential jede Minute bestimmt. Die obere Zahlenreihe gibt die Tropfenzahl an, die untere die insgesamt zugesetzte Menge $AgNO_3$ pro Erythrocyt. Gleichbleiben des Potentials bedeutet Bindung des Silbers.

kleinen Konzentration verzögert, erfolgte aber bei einer größeren schlagartig, wie 2 Kurven auf Abb. 2 zeigen. Sichtbare Hämolyse begann erst nach Anstieg des Potentials, so daß es den Anschein hatte, als ob die zweite Reaktion mit einem schnellen Zerfall der roten Blutkörperchen verbunden war.

In weiteren Untersuchungen wurden die Blutkörperchen mit Wärme vorbehandelt, die unter unseren Versuchsbedingungen, wenn das Blut vom gleichen Tage stammte, zwischen 52° und 56° nur eine unwesentliche Hämolyse (0,5—1,5%) hervorrief, aber zwischen 60° und 64° einen vollständigen Zerfall der Erythrocyten herbeiführte. Der Verlauf der Potentialkurve blieb bei einer Temperatureinwirkung bis zu 48° unverändert (Abb. 2). Dabei kommt der Potentialabfall eindrucksvoller zum Ausdruck, da die Anfangsreaktion in diesen Versuchen nicht in Erscheinung tritt. Um die Umsetzung zu beschleunigen, ließen wir mit einer Geschwindigkeit von 60 Tropfen pro Minute eine 2×10^{-4} molare Silbernitratlösung unter ständigem Umrühren einfließen, so daß die Menge von 1×10^{-16} Mol/Ery., die in dem vorhergehenden Versuch (Abb. 1) durch die erste Reaktion verbraucht wurde, nach 12 sec in der Suspension bereits überschritten wurde. Die Ablesung des Potentials konnte aber nur in Abständen von 15 sec erfolgen.

Nach Vorbehandlung der Blutkörperchen mit Temperaturen von 50° und höheren (Abb. 2) bekamen die Kurven ein völlig anderes Aussehen. Der ausgesprochen steile Abfall und der Potentialanstieg fiel weg, sowohl bei den noch intakten Erythrocyten als auch bei den bereits hämolysierten, wo das Hämoglobin für die Reaktion mit Silber frei zur Verfügung stand. Die Hämolyseart verursacht keinen wesentlichen

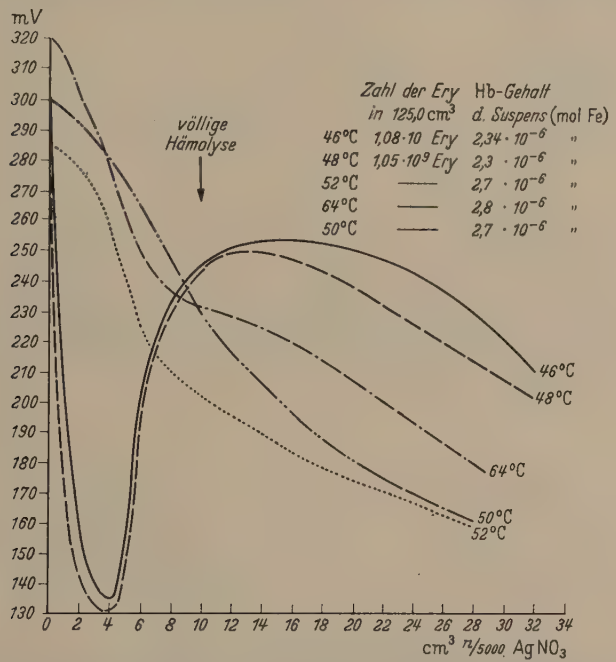


Abb. 2. Frische menschliche Erythrocyten auf bestimmte Temperaturen erhitzt. Nach Abkühlen in physiologischer Natriumnitratlösung suspendiert (125,0 cm³). Potentialmessung Ag^{+}/Ag (Vergleichselektrode 10^{-3} n Ag^{+}/Ag). Unter ständigem Rühren fließt eine n/5000 $AgNO_3$-Lösung mit einer Tropfgeschwindigkeit von 60 min zu. Absinken des Potentials bedeutet Anreicherung und Anstieg Verbrauch von Silber-Ionen.

Unterschied im Kurvenverlauf. Auch das Hämoglobin, welches nach hypotonischer Hämolyse von den Stromata getrennt wurde, was bei den Pferdeerythrocyten sehr leicht gelingt, zeigte das gleiche Verhalten.

Bei genau 49° tritt eine Veränderung in den roten Blutkörperchen ein. Haben höhere Temperaturen eingewirkt, so reagieren die Silber-Ionen direkt. Wir müssen annehmen, daß durch die zusätzliche Schädigung, welche die Silber-Ionen herbeiführen, das Austreten von Hämoglobin erleichtert wird. Deshalb beobachteten wir den zeitlichen Ablauf der Hämolyse. Ein Teil der Blutkörperchensuspension wurde vorher auf 48°, der andere auf 50° erwärmt. Beide Gruppen erhielten nach der Hitzeeinwirkung die gleiche Menge Silbernitrat ($0{,}5 \times 10^{-16}$ Mol/Ery.).

Die erstere verhielt sich so, wie bei Einwirkung einer hämolysierenden Substanz zu erwarten war[8]. Die Kurve nach der Zeit verlief S-förmig (Abb. 3). Dagegen trat die Hämolyse in der 2. Gruppe anfangs schneller

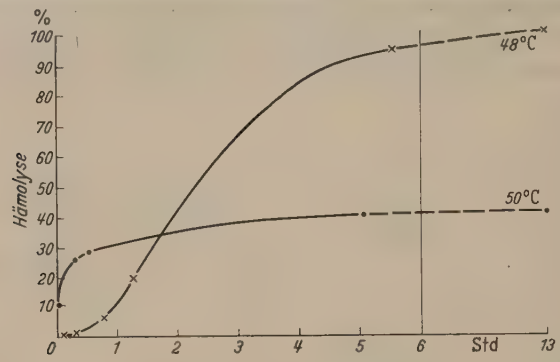


Abb. 3. Silberhämolyse nach Wärmevorbehandlung. Frische menschliche Erythrocyten auf 48° bzw. 50° 2 min erhitzt. In jedem Ansatz 2×10^9 Ery. in 9,5 cm physiologischer $NaNO_3$-Lösung. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur jeweils $0{,}5 \times n/5000$ $AgNO_3$-Lösung hinzugesetzt. ($0{,}5 \times 10^{-16}$ mol $AgNO_3$/Ery.)

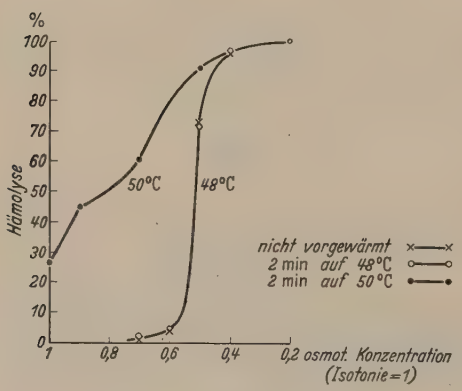


Abb. 4.

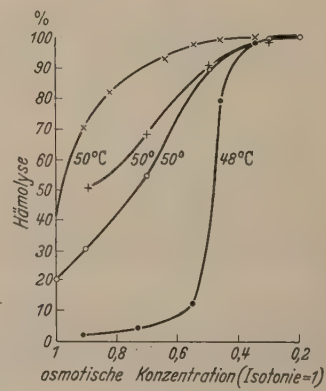


Abb. 5.

Abb. 4. Osmotische Resistenz menschlicher Erythrocyten (1 Tag alt) in $NaNO_3$-Lösungen verschiedener osmotischer Konzentration nach Erhitzen auf 48 und 50° im Vergleich zu nicht erwärmten Blutkörperchen.

Abb. 5. Osmotische Resistenz erhitzter menschlicher Erythrocyten (1 Tag alt), die nach Abkühlen anschließend mit $AgNO_3$ behandelt wurden. Jeweils 2×10^9 Ery. in 9,0 cm physiologischer $NaNO_3$-Lösung. 1. ·——· auf 48° erhitzt, kein $AgNO_3$-Zusatz. 2. +——+ auf 50° erhitzt, kein $AgNO_3$-Zusatz. 3. o——o auf 50° erhitzt, Zusatz von $AgNO_3$ ($0{,}5 \times 10^{-16}$ mol pro Ery.). Einwirkungszeit bis zum Einfüllen in hypotonische $NaNO_3$-Lösung 2 min. 4. ×——× wie 3. behandelt, Einwirkungsdauer des Silbers aber 30 min.

auf, blieb aber bei 30% stehen und stieg innerhalb von 13 Std nicht über 40% (Abb. 3). Silbernitrat wirkt demnach in kleinen Konzentrationen auf Erythrocyten, die über 49° erhitzt wurden, ausgesprochen hemmend auf den Hämolyseablauf. Diese Tatsache ließ sich teilweise

bestätigen durch die Bestimmung der Erythrocytenresistenz gegenüber hypotonischen Natriumnitratlösungen. Die Vorwärmung allein rief keine Resistenzveränderungen bei den Erythrocyten der 1. Gruppe hervor, die nur auf 48° erhitzt waren. In der 2. Gruppe dagegen wurde die Resistenz durch kurze Wärmeeinwirkung von 50° herabgesetzt. Bereits 26% der 1 Tag alten Blutkörperchen waren in isotonischer Nitratlösung hämolysiert (Abb. 4). Ließen wir nun auf Erythrocyten der 2. Gruppe Silbernitrat 2 min bis zum Einfüllen in hypotonische Lösungen einwirken, so wurde die Resistenzminderung nicht etwa verstärkt, sondern im Gegenteil herabgesetzt (Abb. 5). Die gleiche Konzentration hatte selbst bei einer Einwirkungsdauer von 30 min keine Wirkung auf die Resistenzänderung, wenn die roten Blutkörperchen nur auf 48° vorgewärmt wurden. Eine Vorbehandlung mit einer Temperatur von 50° setzte allerdings die Resistenz der Erythrocyten erheblich herab, wenn das Silber über diese lange Zeit einwirken konnte (Abb. 5). Die Hämolysehemmung, die deutlich auf der Abb. 3 zum Ausdruck kommt und über 13 Std verfolgt werden konnte, ist unter den erwähnten Bedingungen nur nach Einwirkung kleiner Mengen bis etwa $0{,}5 \times 10^{-16}$ Mol Silbernitrat/Ery. von einer Verstärkung der Resistenz begleitet (Abb. 5).

Diskussion.

In den beschriebenen Versuchen ist zu unterscheiden zwischen der Schädigung durch die Silber-Ionen und der Veränderung, welche durch Wärmeeinwirkung gesetzt wird. Die erste kommt wahrscheinlich durch Bildung eines undissoziierten Komplexes des Silbers in der Oberfläche des Erythrocyten zustande, die etwa $1{,}0 \times 10^{-16}$ Mol an Silber aufnimmt. Das ist die gleiche Menge, die in den Versuchen von Meneghetti[1] nach ½ Std Hämolyse herbeiführte. Erst viel später, wenn ein größerer Überschuß an Silber-Ionen sich angesammelt hat, setzt die Umsetzung mit dem Hämoglobin ein, wobei die Bindung des Silbers wie aus dem schrägen Abfall der Titrationskurve der hämolysierten Erythrocyten zu entnehmen ist, nicht so fest sein kann wie in der ersten Reaktion. Ob die Silber-Ionen in die Zelle eindringen und dort sich mit dem Hämoglobin verbinden oder ob das Hämoglobin erst austritt, ist wohl nicht entscheidend und läßt sich auch aus den Versuchen nicht schließen. Wirkt das Silber länger auf gewisse Substanzen in der Oberfläche ein, dann kommt es plötzlich zu einer tiefgreifenden Störung, die den Silber-Ionen den Eintritt und dem Hämoglobinmolekül den Austritt erlaubt.

Jacobs und Mitarb.[9] beschrieben die Abnahme der Glycerinpermeabilität bei Anwesenheit von Kupferionen. Wilbrandt[10] wies nach, daß auch Sublimat diese Eigenschaft in spezifischer Weise hemmen kann. Es scheint bei diesen beiden Metallen eine ähnliche Wirkungsweise vorzuliegen, wie wir sie beim Silber beobachten konnten. Kleine Konzentrationen rufen spezifische Veränderungen in den Erythrocytenstromata hervor. Daß der Effekt letztlich eine Wasserstoffionenwirkung

ist, die durch Schwermetallkomplexbildung zustande kommt, wie Wilbrandt[10] annimmt, ist sehr fraglich.

Unabhängig von der Silberwirkung beobachteten wir, daß eine kurzdauernde Erhöhung der Temperatur über genau 49° zur Änderung in der Erythrocytenstruktur Anlaß gibt. Jung[4] hatte bereits früher darauf hingewiesen.

Ham, Shen und Mitarb.[3] beobachteten, daß bei diesem Temperaturpunkt eine Fragmentation der roten Blutkörperchen in kleine sphäroide Teilstücke beginnt, die Hämoglobin in normaler Konzentration enthalten. Bei höherer Temperatur wird dieser Vorgang bedeutend verstärkt. Sie glauben trotzdem, daß eine kurze Erwärmung auf 50—52° zu keiner entscheidenden Veränderung der Erythrocyten in ihrem Verhalten gegen hypotonische Lösungen führt. Auch Wilbrandt[11] nimmt an, daß es für die Kationenpermeabilität, die bei Erwärmung der Erythrocyten allmählich zunimmt, keinen kritischen Temperaturpunkt gäbe. Dieser Ansicht schließt sich auch Jung an[5], der außerdem in neueren elektronenoptischen Untersuchungen fand, daß bei 49° ein bestimmter Bestandteil der Zellmembran koaguliert wird.

Ponder[12] dagegen erbrachte den Beweis, daß die osmotischen Eigenschaften der Zelle bei kurzem Erhitzen auf 48° unverändert bleiben, daß aber nach Erwärmen auf 52° die Schwellungen der intakten Blutkörperchen in hypotonischer NaCl-Lösung wesentlich geringer sind. Als Ursache fand er eine Aufhebung der Kationenimpermeabilität. Kaliumverluste, welche den Natriumeinstrom überwogen, führten eine Kationenkonzentrationsabnahme in der Zelle herbei.

Die beschriebenen Versuche können bestätigen, daß es einen bestimmten Temperaturpunkt gibt, bei dem eine grundlegende Änderung der Feinstruktur in der Erythrocytenoberfläche auftritt. Prüft man die Resistenz der auf 50° erhitzten Erythrocyten nicht, wie es gewöhnlich geschieht, mit hypotonischen Chloridsalzen, sondern mit Nitraten, so ist ihre Resistenz wesentlich vermindert. Dieser Effekt ist besonders auffällig, wenn die Erythrocyten vor der Wärmeeinwirkung ½ Tag in isotonischer $NaNO_3$-Lösung aufgehoben wurden.

Für eine wesentliche Veränderung in der Oberfläche der Zelle bei Erwärmung auf 50°, sprechen die Versuche, bei denen die Silber-Ionen zusätzliche Schädigungen hervorriefen. Die nur auf 48° erhitzten Erythrocytenoberfläche leistete dem Austreten von Hämoglobin und dem Eindringen der Silber-Ionen einen erhöhten Widerstand, der bei Erwärmen auf 50° nicht zu beobachten war. Eine andere Störung spielte sich in der Erythrocytenoberfläche ab, die kurze Zeit über 49° erhitzt wurde, wenn Silber nur in einer Menge unter $1{,}0 \times 10^{-16}$ Mol/Ery. einwirken konnte. Ein Teil des Hämoglobins trat sehr schnell aus. Der Rest mußte sich anscheinend in dem veränderten Stroma niedergeschlagen haben (Abb. 3). Es kann deshalb kein Zweifel darüber bestehen, daß bei dieser Temperatur eine noch unklare Veränderung der hochmolekularen Substanzen im Stroma vor sich geht.

Zusammenfassung.

Silber-Ionen gehen eine undissoziierte Komplexbindung mit Substanzen in der Oberfläche der roten Blutkörperchen ein. Auf 1 Erythrocyten entfallen etwa 1×10^{-16} Mol Silber. Diese Menge führt in etwa 1 Std zur Hämolyse. Höhere Silberkonzentrationen werden vom Hämoglobin gebunden.

49° ist für die roten Blutkörperchen ein kritischer Temperaturpunkt. An der verschiedenen Reaktionsweise des Silber-Ions in niedrigen Konzentrationen mit Erythrocyten, die auf 48° oder auf 50° vorher erwärmt wurden, ließ sich zeigen, daß bei 49° eine Störung im Feinbau der Erythrocytenoberfläche eintrat.

Literatur.

[1] Meneghetti: Biochem. Z. **131**, 38 (1922). — [2] v. Neergaard: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **108**, 295 (1925). — [3] Ham, Shen, Fleming u. Castle: Blood **3**, 373 (1948). — [4] Jung, F.: Klin. Wschr. **1942**, 917. — [5] Jung: Naturwiss. **37**, 229 u. 254 (1950). — [6] Havemann, Jung u. Issekutz: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [7] Müller, E.: Elektrometrische Maßanalyse. Dresden 1944. — [8] Ponder: Hemolysis and related Phenomena, S. 168ff. New York 1948. — [9] Jacobs, Glassman u. Parpart: J. cell. comp. Physiol. **7**, 197 (1935). — [10] Wilbrandt: Pflügers Arch. **244**, 637 (1941). — [11] Wilbrandt: Pflügers Arch. **245**, 22 (1942). — [12] Ponder: J. Gen. Physiol. **32**, 399 (1949.

Dr. Herbert Remmer, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73, Pharmakologisches Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 280—291 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

Über den Einfluß von Monosacchariden auf den Alkoholabbau und die Alkoholtoleranz.

Von

F. Heim, W. Lanz, G. Gries, D. Amelung.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Oktober 1951.)

Die akute Alkoholintoxikation kann u. a. durch Maßnahmen günstig beeinflußt werden, die den Abbau des Alkohols beschleunigen oder die Toleranz gegenüber Äthylalkohol erhöhen. Wir haben unter diesem Gesichtspunkt den Einfluß großer intravenöser Dextrose- und besonders Lävulosegaben auf die Geschwindigkeit des Alkoholabbaues und die Toleranz gegenüber hohen Alkoholdosen an der Katze untersucht.

Die Angaben über den Einfluß von Zuckern auf die Alkoholoxydationsgeschwindigkeit sind unterschiedlich. Durch Traubenzucker allein wird sie nach den Beobachtungen von Schlichting[1], Clark und Morrissey[2] und Goldfarb, Bowman und Parker[3] nicht beschleunigt, während sie bei gleichzeitiger Zufuhr von Traubenzucker und Insulin erhöht ist. Gremels[4] konnte am Menschen bereits nach peroraler Zufuhr eines Gemisches von gleichen Teilen Lävulose und Dextrose eine beschleunigte Abnahme des Blutalkoholspiegels feststellen. Vielleicht ist Lävulose in dieser Hinsicht wirksamer als Dextrose, denn nach Cori[5] und Gremels[6] wird sie leichter zu Glykogen aufgebaut und rascher verbrannt als Dextrose. Nach der Auffassung von Gremels soll der Äthylalkohol im Feuer der Kohlehydrate verbrennen und somit eine Beziehung zwischen der Größe der Kohlehydrat- und Alkoholverbrennung bestehen. Auf die die Alkoholtoleranz steigernde Wirkung der Zucker weisen die Versuche von Haggard und Greenberg[7] hin, daß an hungernden Ratten die letale Blutalkoholkonzentration bei einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels von 70 auf 200 mg% um 50% zunimmt.

In folgender Arbeit wurden weiterhin am Ganztier der Einfluß steigender Äthylalkoholkonzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch und der Anteil der Alkoholverbrennung am oxydativen Gesamtumsatz untersucht, und in vitro der Sauerstoffverbrauch und die anaerobe Glykolyse von Rattenhirnsuspensionen in Gegenwart von Äthylalkohol gemessen.

Methodik.

Die Versuche über den Einfluß von Zuckern auf die Geschwindigkeit des Alkoholabbaues wurden an mit 70 mg/kg Körpergewicht Chloralose narkotisierten, spontan atmenden, bzw. künstlich beatmeten Katzen, die vor Versuchsbeginn 36 Std gehungert hatten, durchgeführt. Die künstlich beatmeten Tiere erhielten 3,2 g/kg Körpergewicht, die spontan atmenden Tiere 1,6 g/kg Äthylalkohol in 15%iger Lösung langsam

intravenös infundiert. 1, 2 und 3 Std nach Beendigung der Infusion wurde der Blutalkoholspiegel bestimmt und daraus der Abfall des Blutalkoholes in mg/L/min berechnet. Nach intravenöser Infusion von 2 g/kg Körpergewicht Lävulose bzw. Dextrose wurde wieder die Blutalkoholkonzentration in 1stündigen Abständen über 3 Std bestimmt und daraus der Abfall des Blutalkohols/min berechnet. Gleichzeitig mit dem Blutalkohol wurde auch der Blutzuckerspiegel bestimmt, nachdem noch vor Beginn der Alkoholinfusion die Nüchternwerte des Blutalkohols und Blutzuckers ermittelt worden waren. Der Sauerstoffverbrauch der Versuchstiere wurde laufend mittels des Krogh'schen Spirometers registriert.

Die Versuche über den Einfluß der Zucker auf die Höhe der minimalletalen Alkoholdosis und den letalen Blutalkoholspiegel wurden ebenfalls an mit 70 mg/kg Körpergewicht Chloralose narkotisierten spontan atmenden bzw. künstlich beatmeten, hungernden Tieren durchgeführt. Der Sauerstoffverbrauch und bei den spontan atmenden Tieren die Atemfrequenz und Atemtiefe wurden wiederum mittels des Krogh'schen Spirometers während des ganzen Versuches laufend registriert. In den Kontrollversuchen ohne vorherige Zuckergaben wurde nach einer mehrstündigen Vorperiode eine intravenöse Dauerinfusion von 0,08 g/min Äthylalkohol in 15%iger Lösung bei den spontan atmenden Tieren bis zum Atemstillstand, bei den künstlich beatmeten Tieren bis zum Herzstillstand durchgeführt. Vor Beginn der Alkoholdauerinfusion und sofort nach Eintritt des Todes wurde der Blutalkoholspiegel bestimmt. Im letzten Falle wurde das Blut durch Herzpunktion gewonnen, sonst durch Aderlaß aus einem Seitenast der Art. femoralis. Die mit Lävulose vorbehandelten Tiere erhielten 4 und 2 Std vor Beginn der Alkoholdauerinfusion je 2 g/kg Körpergewicht Lävulose in 40%iger Lösung intravenös. In diesen Versuchen wurde laufend eine Kontrolle des Blutzuckerspiegels vorgenommen.

Da die Dauer der Alkoholinfusionen in Abhängigkeit vom Körpergewicht und der Toleranz der Tiere zwischen 1 und 10 Std variierte, mußte wegen des mit Beginn der Infusion einsetzenden Alkoholabbaues zur Berechnung der wirklichen letalen Dosis, d. h. der Alkoholmenge, die sich beim Tod der Tiere noch im Organismus befand, von der infundierten Alkoholmenge (A) die bis zum Tode abgebaute Menge abgezogen werden. In Anlehnung an Widmark[8] berechneten wir die D.l.m./kg = $\frac{A}{p} - r \cdot \beta \cdot t$. (p = Körpergewicht in Kilogramm, t = Zeit in Minuten von Beginn der Infusion bis zum Exitus, β = die pro Minute aus dem Blut verschwundene Alkoholmenge, r = Verteilungskoeffizient des Alkohols zwischen Blut und Körpergewebe.) Die Werte für β und r wurden den Versuchen über den Alkoholabbau entnommen, dabei blieb allerdings unberücksichtigt, daß β im Gegensatz zu der Annahme von Widmark[8] nach neueren Befunden von Eggleton[9] und Cutting, Newman und Jee[10] bei Hunden und Katzen eine von der Höhe des Blutalkoholspiegels abhängige Größe darstellen soll. Der Verteilungskoeffizient wurde ebenfalls nach der von Widmark[8] angegebenen Formel berechnet.

Bei den in der Warburg-Apparatur bei 35° C durchgeführten Atmungsversuchen wurden je 200 mg Rattenhirnbrei in 6 cm³ 0,13 mol NaCl—0,03 mol Phosphatpufferlösung von $p_H = 7{,}4$ suspendiert und der Sauerstoffverbrauch in reiner O_2-Atmosphäre gemessen. Bei den Glykolyseversuchen wurde die gleiche Menge Hirnbrei in 6 cm³ Krebs-Ringer-Lösung suspendiert und in 95% N_2, 5% CO_2-Atmosphäre aus der gebildeten CO_2-Menge die entstandene Milchsäure berechnet. Da der respiratorische Quotient des Gehirnes nahezu 1,0 ist (Quastel[11]) und es somit praktisch nur Zucker verbrennt, wurde aus dem O_2-Verbrauch bzw. der anaerob gebildeten Milchsäure der Zuckerverbrauch pro Zeiteinheit berechnet unter der Annahme, daß zur vollkommenen Oxydation von 1 g Dextrose 828 cm³ Sauerstoff verbraucht werden und bei der anaeroben Glykolyse aus 1 Mol Traubenzucker 2 Mol Milchsäure entstehen. Die Glucosezusätze schwankten zwischen 100 bis 500 mg%, die untersuchten Alkoholkonzentrationen zwischen 0,8 bis 4,0 g%.

Versuche.

Der Einfluß von Dextrose und Lävulose auf den Alkoholabbau am künstlich beatmeten Tier.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, betrug bei den künstlich beatmeten Tieren, die 3,2 g Alkohol/kg Körpergewicht erhalten hatten, der Abfall des Blutalkoholspiegels/min im Mittel 3,6 mg/L, nach 2 g/kg Körpergewicht Dextrose 3,5 mg/L und nach 2 g/kg Körpergewicht Lävulose 3,8 mg/L. Diese geringen Abweichungen von 0,1 bzw. 0,2 mg/L liegen innerhalb der mittleren Fehler (Tab. 1, Spalte 3). Der zur Berechnung des Alkoholabbaues benötigte Verteilungskoeffizient des Alkohols zwischen Blut und Gewebe betrug in unseren Versuchen im Mittel 0,79. Wie Eggleton[12] gezeigt hat, nimmt er mit dem Fettgehalt der Tiere ab. Auch sie fand bei fettarmen Katzen einen Verteilungskoeffizient bis zu 0,78. Die von uns verwendeten Tiere befanden sich fast ausnahmslos in einem wenig guten Ernährungszustand. Da nur etwa 93% des verschwundenen Alkoholes verbrannt werden und der Rest unverändert durch Lungen und Nieren ausgeschieden wird, beträgt die pro Minute oxydierte Alkoholmenge $\frac{\beta \cdot r \cdot 93}{100}$. In Spalte 4 der Tab. 1 finden sich die pro Minute verbrannten Alkoholmengen. Wie aus den Zahlen der Spalten 3 und 4 der Tab. 1 hervorgeht, wird der Abfall des Blutalkoholspiegels und die Geschwindigkeit der Alkoholverbrennung weder durch Lävulose- noch durch Dextrosezufuhr praktisch verändert. Die zur Verbrennung der in Spalte 4 angeführten Alkoholmengen bei 18° C benötigten Sauerstoffmengen sind in Spalte 5 eingetragen. Wie aus Spalte 6 hervorgeht, betrug der Sauerstoffverbrauch der Versuchstiere in der Versuchsperiode vor der Alkoholinfusion 6,3 cm³/kg/min und ging

nach der Alkoholinfusion auf 5,8 cm³/kg/min zurück. Im Anschluß an die intravenöse Lävulosezufuhr lag er bei 6,0 und in den mit Dextrose durchgeführten Versuchen im Mittel bei 6,7 cm³/kg/min. Daß Dextrose eine stärkere O_2-Verbrauchssteigerung verursacht als gleichgroße Lävulosegaben, hat bereits GREMELS[4] gezeigt. Aus Spalte 7 ergibt sich schließlich der prozentuale Anteil der Alkoholverbrennung am oxydativen Gesamtumsatz der Tiere.

Der Blutzucker stieg in den mit Dextrose durchgeführten Versuchen im Mittel von 127 mg% vor auf 564 mg% 15 min nach der Traubenzuckerinjektion an und fiel im Anschluß daran während der 3stündigen Beobachtungszeit pro Stunde im Mittel um 134 mg% ab. Bei den Lävuloseversuchen stieg er im Mittel von 134 mg% vor auf 402 mg% 15 min nach der intravenösen Lävuloseinjektion an und fiel pro Stunde um 93 mg% ab. 2 g/kg Dextrose verursachten einen stärkeren Anstieg des Blutzuckerspiegels als Lävulose.

Der Einfluß der Lävulose auf den Alkoholabbau spontan atmender Tiere.

Nachdem in den vorausgegangenen Versuchen festgestellt worden war, daß weder Dextrose noch Lävulose intravenös verabfolgt die Geschwindigkeit des Alkoholabbaues an künstlich beatmeten Katzen

Tabelle 1. *Geschwindigkeit der Alkoholverbrennung und deren Anteil am Gesamtsauerstoffverbrauch vor und nach intravenöser Zufuhr von Lävulose bzw. Dextrose.*

a) Versuche an künstlich beatmeten Katzen.

Spalte 1	2	3	4	5	6	7
	Zahl der Versuche	Abfall des Blutalkohols/ in mg/L	Alkoholoxydat. in mg/kg/min	Zur Oxydation benötigte cm³ O_2	O_2-Verbrauch/ Kg/min in cm³ O_2	Anteil der Alkoholoxydat. am Gesamt-O_2-Verbr. %
Vor	12				6,3 ± 0,36	
Nach 3,2 g/kg Alkohol . . .	12	3,6 ± 0,5	2,6	4,05	5,8 ± 0,34	70
Nach 2 g/kg Lävulose . .	6	3,8 ± 0,7	2,8	4,36	6,0 ± 0,79	67,5
Nach 2 g/kg Dextrose . .	6	3,5 ± 0,4	2,55	4,0	6,7 ± 0,7	60,5

b) Versuche an spontan atmenden Katzen.

Vor	4				20,8 ± 3,1	
Nach 1,6 g/kg Alkohol . . .	4	2,8 ± 0,2	2,1	3,25	21,4 ± 3,0	15,2
Nach 2 g/kg Lävulose . .	4	2,8 ± 0,3	2,1	3,25	20,7 ± 3,4	15,7

nennenswert verändern, beschränkten wir uns in den Versuchen an spontan atmenden Tieren auf die Bestimmung der Alkoholabbaugeschwindigkeit vor und nach Verabfolgung von 2 g/kg Lävulose. Wegen der größeren Alkoholempfindlichkeit erhielten die spontan atmenden Tiere nur 1,6 g/kg intravenös. Wie aus der Tab. 1, Spalte 3 hervorgeht, wird die Geschwindigkeit des Abfalles des Blutalkoholspiegels durch die Lävulose nicht verändert. Unter der Annahme, daß 93% des Alkoholes im Körper oxydiert werden, betrug die vor und nach Zufuhr von Lävulose verbrannte Alkoholmenge 2,1 mg/kg Körpergewicht/min (Tab. 1, Spalte 4) und die zu deren Verbrennung benötigte Sauerstoffmenge bei 18° C 3,25 cm³/min (Tab. 1, Spalte 5). Da die spontan atmenden Tiere infolge aktiver Betätigung der Atemmuskulatur, die durch die Widerstände im Schlauchsystem, Trockenturm, Ein- und Ausatmungsventilen und Spirometer noch gesteigert wurde, einen 3,3 bis 3,7 mal größeren Sauerstoffverbrauch hatten als die künstlich beatmeten Tiere (Tab. 1, Spalte 6), so betrug der Anteil der Alkoholverbrennung am oxydativen Gesamtumsatz ohne Zucker 15,2% und nach Lävulosezufuhr 15,7% (Spalte 7).

Der Einfluß der Lävulose auf die Alkoholtoleranz künstlich beatmeter Katzen.

Wie aus der Tab. 2, Spalte 3 hervorgeht, betrug bei 5 unvorbehandelten Tieren die D.l.m. nach Abzug der während der Infusionsdauer

Tabelle 2. *Einfluß von Lävulose auf die mittlere letale Alkoholdosis und Blutalkoholkonzentration.*

a) Versuche an künstlich beatmeten Katzen.

Spalte 1	2	3	4	5	6	7
	Zahl der Versuche	Ohne Lävulose	Zahl der Versuche	Nach 2×2 g/kg Lävulose	Änderung in %	Sign. Diff.
D.l.m. in g Alkohol/kg	5	9,47 ± 0,85	5	15,0 ± 1,5	+ 58	3,2
Blutalkohol in g/l . .	5	14,0 ± 1,15	5	24,1 ± 1,0	+ 72	6,3

b) Versuche an spontan atmenden Katzen.

D.l.m. in g Alkohol/kg	5	2,2 ± 0,37	5	4,64 ± 0,95	+ 111	2,4
Blutalkohol in g/l . .	5	3,33 ± 0,56	5	7,43 ± 1,1	+ 123	3,15

abgebauten Alkoholmengen im Mittel 9,47 g/kg Körpergewicht, die unmittelbar nach Eintritt des Herzstillstandes bestimmte Blutalkoholkonzentration 14,0 g/L. Die Vorbehandlung mit 2 mal 2 g/kg Körpergewicht Lävulose erhöhte die D.l.m. um 58%, die letale Alkoholkonzentration um 72% (Tab. 2, Spalte 5 und 6). Der Blutzucker lag bei den

mit Lävulose vorbehandelten Tieren vor der 1. Lävulose-Injektion im Mittel bei 150 mg% vor Beginn der Alkoholinfusion, also 2 Std nach der 2. Lävuloseinjektion bei 310 mg%. Er stieg während der Alkoholinfusion um 75 mg% an, so daß er beim Tod der Tiere im Mittel 385 mg% betrug.

Das Verhalten des Sauerstoffverbrauches künstlich beatmeter Tiere während der Alkoholinfusion geht aus Tab. 3 hervor. Alkoholmengen bis zu 75% der D.l.m. senkten den Sauerstoffverbrauch bei den Kontrolltieren um 13%, bei den mit Lävulose vorbehandelten Tieren um 21%. Erst während der Infusion der letzten 25% der D.l.m. fiel der Sauerstoffverbrauch kritisch ab.

Tabelle 3. *Änderung des O_2-Verbrauchs künstlich beatmeter Katzen während einer intravenösen Dauerinfusion von 0,08 g Äthylalkohol/min. Mittelwerte aus 10 Versuchen.*

Ohne Zuckervorbehandlung.

Infundierte Alkoholmenge in g/kg	Prozent der D.l.m.	O_2-Verbrauch/kg/min	Änderung in %
Vor	—	6,32	—
2,38	25	6,05	— 4,3
4,76	50	5,70	—10
7,14	75	5,50	—13
Mit 2×2 g/kg Lävulose vorbehandelte Tiere.			
Vor	—	5,82	—
3,75	25	5,94	+ 2
7,56	50	5,46	— 6,2
11,25	75	4,56	—21,0

Der Einfluß der Lävulose auf die Alkoholtoleranz spontan atmender Tiere.

Die intravenöse Dauerinfusion von 0,08 g Alkohol/min führte bei den spontan atmenden Tieren zum Atemstillstand, dem 4—10 min später erst der Herzstillstand folgte. Bei den unvorbehandelten Tieren betrug die D.l.m. im Mittel 2,2 g/kg Körpergewicht und der damit korrespondierende Blutalkoholspiegel 3,33 g/L. (Tab. 2, Spalte 3). Wie aus einem Vergleich mit den entsprechenden Werten bei den künstlich beatmeten Tieren hervorgeht, wurden durch künstliche Beatmung die D.l.m. um das 4,3fache, der letale Blutalkoholspiegel um das 4,2fache gesteigert. Bei den Tieren, die 4 und 2 Std vor Beginn der Alkoholdauerinfusion je 2 g/kg Körpergewicht Lävulose erhalten hatten, lagen die D.l.m. um 111% und der Blutalkoholspiegel um 123% über den Mittelwerten der Kontrollversuche (Tab. 2, Spalte 5 und 6). Der Blutzucker, der vor der 1. Lävuloseinjektion im Mittel 121 mg% betrug, lag zu Beginn

der Alkoholdauerinfusion, also 4 Std nach der 1. und 2 Std nach der 2. intravenösen Lävuloseinjektion, im Mittel bei 260 mg%. Er stieg während der Alkoholdauerinfusion an und betrug beim Tode der Tiere im Mittel 310 mg%. Im Gegensatz zu den künstlich beatmeten Tieren beobachteten wir bei den spontan atmenden, wie auch aus Abb. 1 hervorgeht, zu Beginn der Alkoholdauerinfusion, eine O_2-Verbrauchsteigerung, die mit einer Beschleunigung und Vertiefung der Atmung und somit mit einer Zunahme des Atemminutenvolumens einherging.

Das in Abb. 1 wiedergegebene Versuchsbeispiel gibt das Verhalten des Blutzuckerspiegels, des Sauerstoffverbrauches, des Atemminuten-

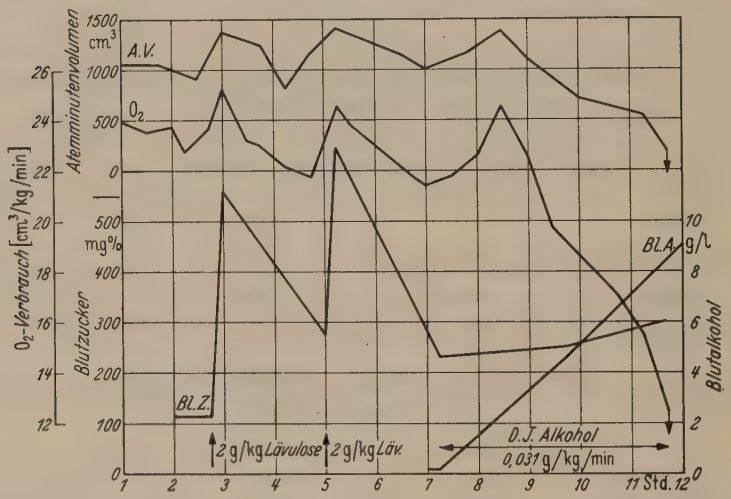


Abb. 1. Katze 2900 g, 70 mg/kg Chloralose, Spontanatmung. O_2 = Sauerstoffverbrauch/kg/min. *A.V.* = Minutenvolumen der Atmung. *Bl.Z.* = Blutzucker. *Bl.A.* = Blutalkohol.

volumens und des Blutalkoholspiegels an einer mit Lävulose vorbehandelten, spontan atmenden Katze vor und während der intravenösen Alkoholdauerinfusion wieder. Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, folgt der nach der Zuckerinfusion einsetzenden O_2-Verbrauchssteigerung und Zunahme des Atemminutenvolumens eine zweite Phase, in der der Sauerstoffverbrauch unter die Ausgangswerte absinkt, trotz eines noch erhöhten Blutzuckerspiegels. Die Abbildung zeigt weiterhin, daß durch kleine und mittlere Alkoholkonzentrationen eine mit Erhöhung des Atemminutenvolumens einhergehende Sauerstoffverbrauchssteigerung hervorgerufen wird, an die sich eine in diesem Versuch sehr protrahiert verlaufende O_2-Verbrauchssenkung anschließt. Schließlich beobachten wir auch in diesem Versuch den bereits erwähnten, während der Alkoholdauerinfusion erfolgenden Blutzuckeranstieg.

Der Einfluß von Äthylalkohol auf den Sauerstoffverbrauch und die anaerobe Glykolyse von Rattenhirnbrei in vitro.

In den Versuchen an Rattenhirnbrei in vitro konnten durch Erhöhung des Zuckergehaltes der Suspensionsflüssigkeit von 100 bis auf 500 mg% weder der Sauerstoffverbrauch noch, unter anaeroben Bedingungen, die Säurebildung nennenswert gesteigert werden. Während durch Alkoholzusätze bis zu 1 g% die Atmung nicht über 10% gehemmt wurde, setzten 2g % Alkohol den Sauerstoffverbrauch nach 3stündiger Versuchsdauer um 21% herab. Die anaerobe Glykolyse wurde durch diese Alkoholkonzentration nur um 2,4% gehemmt. In Abb. 2 wurden die Versuche mit Alkoholzusätzen von 4 g% dargestellt. Bei Verwendung dieser hohen Alkoholkonzentrationen darf darauf hingewiesen werden, daß, wie aus Tab. 2, Spalte 5 hervorgeht, die letale Blutalkoholkonzentration bei mit Lävulose vorbehandelten Tieren bereits 2,4 g% betrug. 4 g% Alkohol setzten den Sauerstoffverbrauch innerhalb der 3stündigen Versuchsdauer um 45%, die anaerobe Glykolyse dagegen nur um 2,5% herab. Unter der Voraussetzung, daß das Hirngewebe nur Zucker verbrennt und die unter anaeroben Bedingungen freiwerdende Säure nur Milchsäure ist, errechnen sich aus Kurve 1 und 2 bzw. 3 und 4 die in Kurve 1a, 2a, 3a und 4a dargestellten Zuckerverbrauchswerte. Bei einem Vergleich der Kurve 1a mit Kurve 3a und Kurve 2a mit Kurve 4a ergibt sich, daß der anaerobe Zuckerabbau ohne Alkoholzusatz das 5,5fache und in Gegenwart von 4 g% Äthylalkohol das 9,5fache des aeroben beträgt.

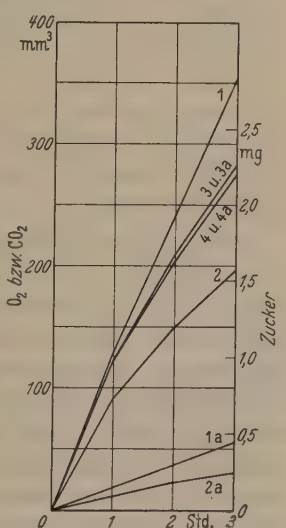


Abb. 2. Kurve 1: O_2-Verbrauch von 200 mg Rattenhirnbrei in 6 cm³ 0,13 m NaCl — 0,03 m Phosphatpufferlösung, p_H = 7,4. Zusatz von 200 mg Glucose. Manometr. Messung in reiner O_2-Atmosphäre. — Kurve 2: Wie Kurve 1 + 4 g% Äthylalkohol. — Kurve 1a und 2a: Aus Kurve 1 und 2 errechneter Zuckerverbrauch. 1 mg Glucose = 828 mm³ O_2. — Kurve 3: Gebildetes CO_2. Ansatz: 200 mg Rattenhirnbrei in 6 cm³ Krebs-RINGER-Lösung. Zusatz von 200 mg Glucose. Messung in 95% N_2 + 5% CO_2-Atmosphäre. — Kurve 4: Wie Kurve 3 + 4 g% Äthylalkohol. — Kurve 3a und 4a: Aus Kurve 3 und 4 errechneter Zuckerverbrauch. 1 Mol CO_2 = 1 Mol Milchsäure = 2 Mol Glucose. — Kurve 1, 2, 3 und 4 = Mittelwerte aus je 6 Einzelversuchen.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Geschwindigkeit des Abbaues des Äthylalkohols wurde an narkotisierten Katzen durch intravenöse Gaben von 2 g/kg Lävulose oder Dextrose nicht beeinflußt. Die geringen Unterschiede vor bzw. nach den intravenösen Lävulose- oder Dextrosegaben liegen, wie Tab. 1, Spalte 5 zeigt, innerhalb der mittleren Fehler der Mittelwerte und sind nicht signifikant. Die Erhöhung der Alkoholgaben von

1,6 g/kg Körpergewicht (spontan atmende Tiere) auf 3,2 g/kg (künstlich beatmete Tiere) führte zu einer Zunahme der Abbaugeschwindigkeit um 27—35%.

Cutting, Newman und Jee[10] haben neuerdings am Hund bei einer Erhöhung der Alkoholgaben von 1,5 auf 3 g/kg Körpergewicht ebenfalls eine Zunahme der Abbaugeschwindigkeit um etwa 35% beobachtet. Zu fast dem gleichen Ergebnis kam Eggleton[9] in Versuchen an Katzen. Diese und unsere Beobachtungen stehen im Widerspruch zu der Annahme Widmarks[8], daß die Abbaugeschwindigkeit von der Höhe des Blutalkoholspiegels unabhängig sei.

Bei künstlicher Beatmung war nach unseren Befunden die Alkoholverbrennung zu 70% am oxydativen Gesamtumsatz beteiligt. Nach Dextrosezufuhr, die zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauches führte, wurden 60% des O_2-Verbrauches zur Alkoholverbrennung beansprucht. Bei den spontan atmenden Tieren, die infolge der aktiven Betätigung der Atemmuskulatur einen 3,5mal größeren O_2-Bedarf zeigten als die künstlich beatmeten Tiere, wurden dementsprechend nur 15,2—15,7% des oxydativen Umsatzes durch die Alkoholverbrennung gedeckt. Diese Versuche zeigen gleichzeitig, daß ein mit gesteigerter Muskelarbeit einhergehender erhöhter Sauerstoffverbrauch die Alkoholverbrennung nicht beschleunigt.

Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen über den Alkoholstoffwechsel (Kochmann[13]). Später haben vor allem Le Breton und Mitarbeiter[14] an verschiedenen Warmblütern, nicht aber an Katzen, die Geschwindigkeit der Alkoholverbrennung und deren Anteil am Gesamtumsatz bestimmt und ebenfalls festgestellt, daß der Alkohol zur Deckung des Grundumsatzes, nicht dagegen des mit Muskelarbeit einhergehenden erhöhten Sauerstoffbedarfs in Anspruch genommen werden kann.

Eine fortlaufende intravenöse Alkoholdauerinfusion führte bei spontan atmenden Katzen zum Tod durch Atemlähmung, bei künstlich beatmeten zum Herzstillstand. Die bei künstlicher Beatmung letalen Alkoholdosen bzw. Blutalkoholkonzentrationen betrugen das 4,3 bzw. 4,2fache der Konzentrationen, die das Atemzentrum lähmten. Die Alkoholempfindlichkeit des Atemzentrums ist demnach 4,25mal größer als die des Kreislaufsystems. Sowohl an spontan atmenden wie auch an künstlich beatmeten Tieren konnte durch große intravenöse Lävulosegaben die Alkoholtoleranz gesteigert werden. Die Unterschiede in der Höhe der letalen Alkoholdosen und der entsprechenden Blutalkoholkonzentrationen zwischen den beiden Versuchsreihen ohne und mit Lävulosevorbehandlung sind, wie Tab. 2, Spalte 7 zeigt, signifikant. Bei gleichzeitiger künstlicher Beatmung und Vorbehandlung mit großen intravenösen Lävulosegaben stieg die D.l.m. von 2,2 auf 15,0 g/kg Körpergewicht und die tödliche Blutalkoholkonzentration von 3,3 auf

24,1 g/L. Die Alkoholtoleranz nahm damit um etwas mehr als das 7fache zu.

Wenn man die während der Alkoholdauerinfusion erfolgenden Änderungen im Sauerstoffverbrauch als Grad der bereits eingetretenen Alkoholschädigung ansehen will, dann geht aus den in Tab. 3 wiedergegebenen O_2-Verbrauchswerten hervor, daß die gleiche infundierte Alkoholmenge bei den Kontrolltieren eine stärkere O_2-Verbrauchssenkung hervorrief als bei den mit Zucker vorbehandelten Tieren, und die für die Kontrolltiere bereits tödliche Alkoholmenge von 9,47 g/kg Körpergewicht bei den mit Zucker vorbehandelten Tieren erst eine O_2-Verbrauchssenkung um etwa 17% verursachte. An spontan atmenden Tieren konnte zu Beginn der Alkoholdauerinfusion regelmäßig eine O_2-Verbrauchszunahme festgestellt werden. Da sie mit einer Steigerung der Atemtätigkeit einherging, und bei den künstlich beatmeten Tieren unter 10 Versuchen nur einmal beobachtet wurde, ist sie nicht auf eine allgemeine Steigerung der Gewebsoxydation, sondern im wesentlichen auf eine Anregung der Atemtätigkeit zurückzuführen.

Bei einem Versuch der Erklärung der toleranzsteigernden Wirkung der Lävulose ist zu berücksichtigen, daß mit der intravenösen Zufuhr dieses schnell assimilierbaren und leicht verbrennbaren Zuckers dem durch die vorausgegangenen 36stündigen Hungerperioden glykogenverarmten Organismus das vor allem für die Nerven- und Herzmuskelzellen wichtigste energieliefernde Substrat in großen Mengen zur raschen Verwertung zugeführt wurde.

In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß die Zuckerzufuhr als solche ohne nennenswerte Energieverbrauchssteigerung blieb. Denn die initiale, der Zuckerinjektion folgende O_2-Verbrauchszunahme wurde, wie auch aus Abb. 1 hervorgeht, regelmäßig durch eine anschließende mit einer O_2-Verbrauchssenkung einhergehenden assimilatorische Phase nahezu vollkommen kompensiert. Es sei weiterhin festgestellt, daß nach der 2maligen Zufuhr von je 2 g/kg Lävulose der Blutzucker vor Beginn der Alkoholdauerinfusion bei den spontan atmenden und künstlich beatmeten Tieren um 114 bzw. 107% über dem Nüchternwert lag und während der Alkoholdauerinfusion bis zum Tode noch um weitere 50 bzw. 75 mg% anstieg. Der Alkohol scheint eine Mobilisierung und vermehrte Abgabe von Zucker in das Blut zu bewirken (siehe hierzu auch Abb. 1). Nach Himwich und Fazekas[15] ist die Penetrationsgeschwindigkeit des Zuckers in die Nervenzelle und somit deren jeweiliger Kohlenhydratgehalt von der Höhe des Blutzuckerspiegels abhängig. Andererseits hat Uchida[16] gezeigt, daß unter der Einwirkung von Narkotica das Gehirn bis zu 50% seines Glykogengehaltes einbüßen kann.

Die Versuche in vitro an Rattenhirnbrei haben ergeben, daß der Zuckerverbrauch in Gegenwart von Alkohol unter anaeroben Bedingungen das 9,5fache der Zuckermenge betragen kann, die unter aeroben Bedingungen verbrannt wird. Es besteht die Möglichkeit, daß am Ganztier unter der Einwirkung hoher Alkoholkonzentrationen infolge zunehmender Verschlechterung der Atem- und Kreislauftätigkeit die

Sauerstoffversorgung speziell des Gehirnes und des Herzmuskels soweit zurückgeht, daß diese Gewebe zu einer zeitweiligen oder partiellen Umschaltung auf die anaerobe Energiegewinnung gezwungen sind. Da aber der Substratverbrauch unter anaeroben Bedingungen gegenüber dem bei Zuckerverbrennung um etwa das 10fache erhöht ist, so wird die anaerobe Energiegewinnung nur unter der Voraussetzung des Vorhandenseins genügender Substratmengen für eine längere Zeit möglich sein.

Wenn wir auch annehmen möchten, daß die toleranzsteigernde Wirkung der Lävulose in einer Verhinderung des Zusammenbruches der energetischen Prozesse in den Zellen speziell des Zentralnervensystems und des Herzmuskels zu suchen ist, so muß auch die Schutzwirkung der Zucker gegenüber dem den Leberstoffwechsel schädigenden Alkohol berücksichtigt werden.

Rosenthal[17], Wallace[18] und McNider[19] konnten schon nach einmaliger größerer Alkoholaufnahme bei Mensch und Tier Leberschädigungen auch histologisch nachweisen. Weiterhin sei die von Schimert[20] nachgewiesene, langanhaltende coronargefäßerweiternde Wirkung der Lävulose erwähnt, und schließlich auf das gegensätzliche physikalisch-chemische Verhalten der Narkotica und der Zucker gegenüber Kolloiden hingewiesen. Während nach Winterstein[21], Kochmann[22], Wels[23], Barbour[24], Sivadjian[25] und Heim[26] Narkotica dehydratisierend, quellungshemmend und permeabilitätsmindernd wirken, besitzen Zucker nach Bechold[27], Emden und Adler[28], Vogel[429] und Hiruma[30] einen quellungs- und permeabilitätsfördernden Einfluß.

Zusammenfassung.

An mit Chloralose narkotisierten, künstlich beatmeten Katzen waren intravenöse Lävulose- und Dextrosegaben von 2 g/kg Körpergewicht ohne Einfluß auf die Geschwindigkeit des Abfalles des Blutalkoholspiegels und die Alkoholverbrennung. Der Anteil der Alkoholverbrennung am oxydativen Gesamtumsatz der Tiere betrug 60,5—70% und wurde durch die beiden Zucker nicht wesentlich beeinflußt. Auch an spontan atmenden Tieren blieb die intravenöse Zufuhr von Lävulose ohne Einfluß auf die Geschwindigkeit des Alkoholabbaues. Da der Sauerstoffverbrauch der spontan atmenden Tiere das 3,3—3,7fache des O_2-Verbrauches der künstlich beatmeten Tiere betrug, war die Alkoholverbrennung nur zu 15,2—15,7% am oxydativen Gesamtumsatz beteiligt. Die D.l.m. für Alkohol und die letale Blutalkoholkonzentration betrugen bei Zufuhr des Alkoholes in Form einer intravenösen Dauerinfusion an spontan atmenden Tieren 2,2 g/kg Körpergewicht bzw. 3,33 g/L., an künstlich beatmeten Tieren 9,47 g/kg bzw. 13,97 g/L. Das Atemzentrum erwies sich als 4,3mal empfindlicher gegenüber Alkohol als das Kreislaufsystem. Sowohl bei spontaner Atmung als auch bei künstlicher Beatmung konnte durch Vorbehandlung mit Lävulose (4 g/kg Körpergewicht) die Alkoholtoleranz gesteigert werden. Niedrige

Alkoholkonzentrationen wirkten an spontan atmenden, nicht dagegen an künstlich beatmeten Tieren sauerstoffverbrauchssteigernd. Nach in vitro-Versuchen an Rattenhirnbrei wird der Sauerstoffverbrauch, nicht dagegen die anaerobe Glykolyse durch Alkoholkonzentrationen zwischen 1—4 g% gehemmt. Es wurden die Gründe für die toleranzsteigernde Wirkung der Lävulose gegenüber Alkohol erörtert.

Literatur.

[1] Schlichting, H.: Diss. Berlin 1935. — [2] Clark, B., u. R. W. Morrissey: Science **1938**, 285. — J. of Physiol. **123**, 37 (1938). — [3] Goldfarb, W., K. Bowman u. S. Parker: J. Clin. Invest. **43**, 581 (1939). — [4] Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 57 (1948). — [5] Cori, C.: J. biol. Chem. **76**, 755 (1928). — [6] Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 255 (1944). — [7] Haggard, H. W., u. L. A. Greenberg: Science **85**, 608 (1937). — [8] Widmark, E.: Kgl. fysiogr. Sällsk. Hdl. N. F. Bd. 41, Nr. 9. — [9] Eggleton, M. G.: J. of Physiol. **98**, 239 (1940). — [10] Cutting, W., H. Newman u. J. Jee: J. of Physiol. **110**, 18 (1949). — [11] Quastel, J. H.: Physiologic. Rev. **19**, 135 (1939). — [12] Eggleton, M. G.: J. of Physiol. **98**, 228 (1940). — [13] Kochmann: Heffters Handb. d. exper. Pharmakol. Bd. I u. Erg.-Bd. II. — [14] Le Breton, E., u. Mitarb.: C. r. Acad. Sci. Paris **200**, 1133 (1935). — C. r. Soc. Biol. Paris **122**, 561, 565 (1936). — Bull. Soc. Chim. **19**, 17 (1937). — [15] Hinwich, H., u. J. K. Fazekas: Endocrinology **21**, 800 (1937). — [16] Uchida: Biochem. Z. **167**, 9. — [17] Rosenthal, S. M.: J. of Pharmacol. **38**, 291 (1930). — [18] Wallace, R. P.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **24**, 598 (1927). — [19] McNider, B.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **30**, 78 (1931). — [20] Schimert: Ärztl. Forschg **1950**, H. 7. — [21] Winterstein, H.: Biochem. Z. **75**, 71 (1916). — [22] Kochmann, M.: Biochem. Z. **136**, 49 (1923). — [23] Wels, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **116**, 67 (1926). — [24] Barbour, H. G.: Science **73**, 346 (1931). — [25] Sivadjian, J.: Bull. Sci. pharmakol. **40**, 292 (1933). — [26] Heim, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191**, 212 (1938). — [27] Bechold, H.: Die Kolloide in Biologie u. Medizin 1929. — [28] Emden, G., u. Adler: Z. physiol. Chem. **118**, 63 (1922). — [29] Vogel: Z. physiol. Chem. **118**, 63 (1923). — [30] Hiruma: Pflügers Arch. **200**, 497 (1923).

Prof. Dr. F. Heim, Marburg/Lahn, Pharmakologisches Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 292—298 (1952).

Aus dem Physiologischen Institut Tübingen.

Acetylcholinkontraktur und Acetylcholindiffusion.

Von

K. Brecht.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. November 1951.)

Die Diffusionseigenschaften des Acetylcholins (ACh) sind für die Klärung des Wirkungsmechanismus dieses Stoffes an den verschiedensten Geweben von entscheidender Bedeutung. In einer früheren Untersuchung (Brecht u. Feneis) haben wir bereits auf die Bedeutung des Diffusionsverhältnisse für die ACh-Kontraktur des Skeletmuskels hingewiesen. In der vorliegenden Arbeit sollen diese Verhältnisse noch etwas eingehender behandelt werden.

Registriert man die Verkürzung eines Kaltblütermuskels im ACh-Eintauchversuch als Spannungsmechanogramm, so fällt folgendes auf:

1. Das Maximum der Verkürzung (bzw. Spannung) wird meist schon in wenigen Sekunden (etwa 10—20 sec) nach dem Eintauchen in ACh angenähert erreicht. Ist, so fragt man sich, an dieser Reaktion der ganze Muskel beteiligt? Mit anderen Worten: Kann das ACh in der kurzen Zeit — sagen wir von 10 sec — auch Muskelfasern in den innersten Schichten des Muskels erreichen? Die Beantwortung dieser Frage erfordert die Klärung der Diffusionsverhältnisse.

2. Bei Betrachtung der Spannungskurve fällt weiterhin auf — und ist schon früher aufgefallen (Riesser und Richter) —, daß der Muskel selbst unter hohen ACh-Dosen höchstens etwa 10—15% der Spannung liefert, die er bei einem Tetanus unter elektrischer Reizung zu entwickeln vermag. Auch hier muß man sich fragen, ob im ACh-Eintauchversuch vielleicht deswegen keine höhere Spannung entwickelt wird, weil zunächst eben nur eine schmale Schicht von Muskelfasern der Peripherie in Aktion treten kann. Also auch hier erhebt sich die Frage nach den Diffusionsverhältnissen.

Um etwas näheres über das Schicksal des in den Muskel eindringenden ACh zu erfahren, wurden daher Diffusionsversuche durchgeführt:

1. Zunächst wurde die Diffusionsgeschwindigkeit des ACh bei freier Diffusion in Wasser mit der Bergoldschen Diffusionskammer bestimmt[1]. Die Diffusionskonstante beträgt: $D = 100 \cdot 10^{-7}$ cm^2 sec^{-1}.

[1] Für diese Versuche danken wir Frl. Dr. Portzehl am Institut.

2. Sodann wurde die Diffusionskonstante des ACh für den Muskel bestimmt. Es wurden dünne, flache Muskeln (Rectus und Cutaneus pectoris des Frosches) auf ein Glasröhrchen aufgebunden (ähnlich Abb. 2). Das Glasröhrchen, das mit 2—3 cm³ RINGER-Lösung aufgefüllt war, wurde in ein großes Glasgefäß mit ACh-RINGER eingehängt, so daß ACh durch die Muskelmembran in die dauernd gerührte RINGER-Lösung des Glasröhrchens diffundieren konnte. Das hindurchgewanderte ACh wurde mit Hilfe des Rectustestes bestimmt. Bei diesen Versuchen wurde sowohl die Außenkonzentration des ACh (10^{-5}—10^{-3}) als auch die Dicke der Muskelmembran und die Diffusionszeit variiert. Die Diffusionskonstante konnte dann mit Hilfe der FICKschen Gleichung errechnet werden. Diese Gleichung wurde auf die vereinfachte Form gebracht[1]:

$$D = \frac{c_i}{c_a} \cdot \frac{V \cdot d}{F \cdot t}$$

(c_i = Konzentration des durchdiffundierten ACh, c_a = ACh-Außenkonzentration, V = Volumen der Flüssigkeit im Glasröhrchen, d = Dicke der Muskelmembran, F = Diffusionsfläche, t = Diffusionszeit.)

Tab. 1 gibt die auf diese Weise gefundenen Diffusionskonstanten. Der Mittelwert beträgt $5 \cdot 10^{-7} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$, liegt also größenordnungsmäßig um etwa 2 Zehnerpotenzen niedriger als bei freier Diffusion. Es

Tabelle 1.

Muskel	Scheinbare Diffusionskonstante
Rectus abdominis . . .	$2{,}6 \cdot 10^{-7}$
„ „ . . .	$7{,}9 \cdot 10^{-7}$
„ „ . . .	$9{,}0 \cdot 10^{-7}$
„ „ . . .	$0{,}27 \cdot 10^{-7}$
„ „ . . .	$1{,}6 \cdot 10^{-7}$
„ „ . . .	$1{,}5 \cdot 10^{-7}$
„ „ . . .	$1{,}3 \cdot 10^{-7}$
Cutaneus pectoris . . .	$0{,}14 \cdot 10^{-7}$
„ „ . . .	$0{,}9 \cdot 10^{-7}$
„ „ . . .	$1{,}4 \cdot 10^{-7}$

handelt sich hierbei, da an ganzen unbehandelten Muskelmembranen gearbeitet wurde, um eine *scheinbare Diffusionskonstante*, weil ein Großteil des Wirkstoffes durch die Intercellularspalten hindurchwandern kann und die Diffusion von dem teilweisen Abbau des Wirkstoffes durch die Cholinesterase entscheidend beeinflußt wird. Aber gerade diese Verhältnisse sind für das vorliegende Problem maßgebend, da sie beim ACh-Eintauchversuch genau so vorliegen.

[1] Herrn Dr. HASSELBACH am Institut verdanke ich diese und die nächste Formel, die er bei Versuchen über die Bestimmung der Diffusionskonstante des ATP im Muskel entwickelt hat.

Will man z. B. berechnen, wie weit das ACh in einen Gastrocnemius im Eintauchversuch eindringen kann, so läßt sich folgende Formel anwenden:

$$c_{i(x,t)} = c_a - c_a \Phi\left(\frac{x}{2\sqrt{t \cdot d}}\right)^*$$

(c_i = ACh-Konzentration im Muskel; c_a = praktisch konstante ACh-Konzentration in einem großen Eintauchgefäß; x = Entfernung von der Muskeloberfläche in Zentimeter; t = Zeit in Sekunden; D = Diffusionskonstante $cm^2\ sec^{-1}$).

Setzt man für $t = 15$ sec (etwa die Zeit bis zur Entwicklung des Spannungsmaximums beim ACh-Eintauchversuch), für $D = 5 \cdot 10^{-7}$ $cm^2\ sec^{-1}$ (von uns gefundene Diffusionskonstante) und für $x = 10^{-2}$ cm, so ergibt sich:

$$\Phi\left(\frac{x}{2 \cdot \sqrt{t \cdot D}}\right) = 0{,}989.$$

D. h. c_i ist in der Entfernung von $^1/_{10}$ mm nach 15 sec etwa 1% der Außenkonzentration. Ist c_a z. B. 10^{-5}, dann ist die Konzentration im Abstand $^1/_{10}$ mm von der Oberfläche nach 15 sec nur noch 10^{-7} und steigt hier und noch weiter ins Innere so langsam an, daß sich der Wirkstoff einschleicht.

Die verwendete Formel genügt zur Darstellung des Konzentrationsverlaufes, obwohl es sich eigentlich um ein Zylinderproblem handelt, da bei der kleinen Diffusionskonstante des AChs die Ausdehnung des Muskels für die in Frage stehende Zeit als praktisch unendlich angenommen werden kann.

3. Es wurde noch auf andere Weise versucht, etwas über das Schicksal des in den Muskel eindiffundierenden ACh zu erfahren. (Diese Versuche wurden an anderer Stelle bereits kurz beschrieben, Brecht und Feneis.)

Der isolierte Gastrocnemius z. B. wurde am beckennahen Ende unter Bildung von 4 Zipfeln gefaßt (in Abb. 1 der Vereinfachung wegen nicht dargestellt) und bei leichter Entfaltung nach außen fest aufgespannt. In der Mitte des Muskels wurde ein schmaler Zentralkanal gebohrt und von oben ein feiner Glasstab eingeführt. An seinem unteren Ende wurde ein dünnes Muskelbündel aus dem Rectus befestigt, das nach oben mit einem Torsionsmyographen verbunden war. Das ganze wurde in ein größeres Gefäß mit ACh-Ringer (10^{-3}) so versenkt, daß der Flüssigkeitsspiegel einige Millimeter unterhalb der Muskelöffnung lag, damit keine Flüssigkeit von außen in den Zentralkanal gelangen konnte.

Ergebnis: Das Rectusbündel hat sich selbst nach 30—60 min und noch länger dauernder Diffusionszeit nicht kontrahiert. Ließ man dann die ACh-Ringer-Lösung von oben in den Zentralkanal einlaufen, so

* Die Gausssche Fehlerfunktion Φ kann aus dem Tabellenwerk Jahnke-Emde entnommen werden.

kontrahierte sich das Testbündel in manchen Fällen ein wenig, in anderen dagegen — trotz der hohen ACh-Konzentration — nicht. Es lag die Vermutung nahe, daß dann, wenn sich das eingesenkte Rectusbündel im Nachtest noch kontrahierte, nur wenig oder kein ACh ins Muskelinnere gelangt war, daß dagegen bei dünneren Muskeln und

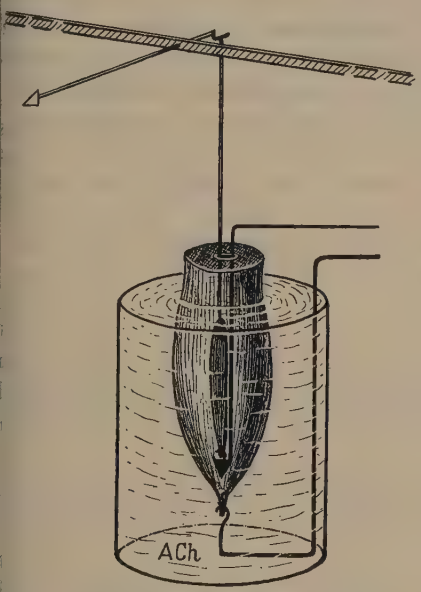


Abb. 1. Ganzmuskeldiffusionsversuch (s. Text).

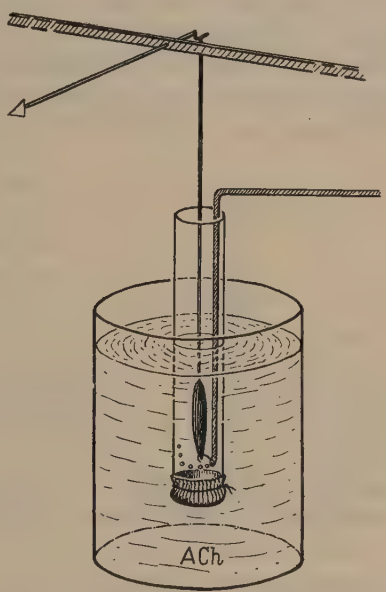


Abb. 2. Membrandiffusionsversuch (s. Text).

längerer Diffusionszeit mehr ACh eindringen kann, aber so langsam, daß sich der ACh-Reiz einschleicht, also eine Akkommodation zustande kommt.

Daß das so ist, wurde auf folgende Weise wahrscheinlich gemacht (Abb. 2):

Glasröhrchen von 2 cm^3 Volumen wurden am unteren Ende durch Aufbinden einer dünnen Muskelmembran aus dem Cutaneus pectoris, dem Rectus (ohne Bindegewebsscheiden) oder dem Transverus des Frosches abgeschlossen. In das mit Ringer-Lösung gefüllte Röhrchen tauchte ein mit einem Torsionsmyographen verbundenes Rectusbündel. Das Ganze tauchte seinerseits in ein größeres mit ACh-Ringer von hoher Konzentration (z. B. 10^{-2}) gefülltes Gefäß. Die Innenflüssigkeit des Röhrchens wurde durch Luftperlung dauernd gerührt.

Ergebnis: Nur bei sehr dünnen Muskelmembranen und hoher ACh-Außenkonzentration bekommt man gelegentlich Bilder, wie sie die nächste Abbildung zeigt (Abb. 3). Man sieht, wie sich der Testmuskel innerhalb von 20 min nur langsam und wenig kontrahiert, während die gleiche ACh-haltige Flüssigkeit des Diffusionsröhrchens eine rasch ansteigende hohe Spannungsentwicklung bewirkt, wenn sie plötzlich auf

den gleichen, vorher ausgewaschenen Rectusstreifen einwirkt. Sind die Muskelmembranen dicker und die Außenkonzentrationen geringer (10^{-4} oder 10^{-5}), so bekommt man bei dieser Anordnung überhaupt keine Kontraktion, obgleich ACh in nachweisbaren Mengen hindurchdiffundiert, d. h. aber, die Akkommodation ist vollständig.

Somit zeigen also alle die hier kurz besprochenen verschiedenen Versuche, daß ACh innerhalb kurzer Zeiträume unmöglich in die inneren Schichten eines Muskels hineindiffundieren kann oder, wenn es bei höheren Konzentrationen und längeren Zeitintervallen allmählich doch hineingelangt, es sich einschleicht. Ein plötzlicher ACh-Reiz trifft also

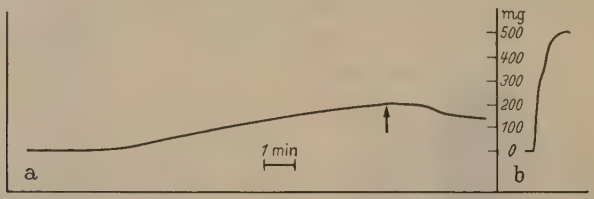


Abb. 3. Einschleichversuch. *a*) Spannungsentwicklung des Rectus-Testbündels während der Acethylcholin-Eindiffusion. Beim Pfeil: Auswaschen mit Ringer-Lösung. *b*) die gleiche ACh-haltige Diffusionsflüssigkeit vom Versuch *a* wirkt plötzlich auf das ausgewaschene Rectusbündel von *a*. Eichung in Milligramm (s. Text).

im Eintauchversuch nur die äußeren Faserschichten. Damit erklärt sich aber ziemlich zwanglos die geringe Spannungsentwicklung des Ganzmuskels im Eintauchversuch.

In einer früheren Arbeit (Brecht und Feneis) konnten wir zeigen, daß die maximale Spannungsentwicklung einer einzelnen Muskelfaser unter ACh an die Größenordnung der Spannungen eines maximalen Tetanus heranreicht, etwa 1 kg/cm². Wir haben damals aus einem Vergleich zwischen der Spannungsentwicklung des Ganzmuskels (Anconäus) und derjenigen einer Einzelfaser unter ACh annäherungsweise berechnet, wieviel Fasern an der anfänglichen Spannungsentwicklung des Ganzmuskels im Eintauchversuch beteiligt sind. Es kam dabei heraus, daß ein äußerer Faserring von größenordnungsmäßig etwa 100 μ Durchmesser für diese Spannung beim Eintauchen verantwortlich ist. Mehr kann in dieser kurzen Zeit aus Diffusionsgründen vom ACh nicht erfaßt werden. Dies stimmt gut mit dem weiter oben besprochenen, auf rechnerischem Wege erhobenen Befund überein. Die Beobachtung, daß bei der gleichen Muskelart die Spannungsentwicklung im ACh-Eintauchversuch mit zunehmender Muskelgröße nicht zunimmt (Krüger), spricht ganz für die hier gegebene Deutung. Entscheidend ist eben immer nur der äußere Faserring.

Die nächste Frage ist nun die: Wie erklärt sich der weitere Verlauf der ACh-Verkürzungskurve, nachdem das Maximum erreicht ist? Theoretisch sind 3 Möglichkeiten gegeben: Die Kurve fällt ab, sie bleibt über längere Zeit konstant oder sie steigt weiter an. Tatsächlich sind auch alle 3 Möglichkeiten realisiert. 1. Abfall beim „phasischen" Muskel, z. B. ACh-„Kontraktur" des Sartorius. 2. Konstante Dauerverkürzung bei der ACh-„Kontraktur" des „tonischen" Muskels, z. B. beim Rectus

3. Weiterer Anstieg der Kurve, allerdings nicht unter ACh-Wirkung, aber z. B. bei der Chloroform- und Säurekontraktur.

Was läßt sich hierzu vom Standpunkt unserer Diffusionsbetrachtungen aus sagen? Wir gehen von folgender Beobachtung aus. Ein „tonischer" Muskel reagiert auf ACh um so kürzer, je kleinere Muskelbündel man verwendet. Ein ganzer Rectus z. B. bleibt lange kontrahiert. Nimmt man kleine Rectusbündel und entfernt man dazu noch sorgfältig die umgebenden Bindegewebsscheiden, so ist die Spannung (resp. Verkürzung) schon nach kurzer Zeit — in der Abb. 4 nach 30 sec auf ein Drittel — abgesunken. Dies hat auch Rössel am ganzen Rectus mit abgezogenen Bindegewebsscheiden festgestellt. Nimmt man einzelne Muskelfasern, so ist der Abfall meist noch rascher. Auf Grund dieser Befunde und der besprochenen Diffusionsergebnisse könnte man das „tonische" Verhalten von Muskeln im Eintauchversuch vielleicht so erklären (einwandfrei erwiesen ist das allerdings noch nicht): Die Anfangsspannung wird von dem äußeren Faserring geliefert. In dem Maße, wie diese Fasern erschlaffen, werden sie von der allmählichen Verkürzung der folgenden Faserschichten abgelöst. Der Vorgang wiederholt sich schichtweise, und die Verkürzung bleibt über längere Zeit bestehen, ohne sich weiter zu verstärken.

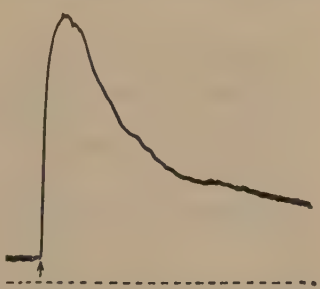


Abb. 4. Die Wirkung von Acetylcholin auf einen Rectusstreifen, dem vorher die beiderseitigen Bindegewebsscheiden abpräpariert wurden. Zeit: 2 sec (s. Text).

Auch beim „phasischen" Muskel wird die Spannung zunächst durch den äußeren Faserring geliefert. Auch hier diffundiert das ACh weiter. Aber entweder ist die Erregbarkeit dieser Fasern geringer oder das ACh diffundiert langsamer — wahrscheinlich spielen beide Faktoren eine Rolle, und in beiden Fällen könnte ein erhöhter Esterasegehalt neben anderen Momenten von Bedeutung sein, — die Fasern der inneren Schichten kommen jedenfalls durch Akkommodation nicht ins Spiel, der ACh-Reiz schleicht sich ein. Die Gesamtverkürzung geht rasch zurück.

Und schließlich der 3. Fall: Auch bei der Säurekontraktion, z. B. Milchsäure, reagieren zunächst die äußeren Schichten. Da dieser Vorgang aber bekanntlich schlecht reversibel ist, bleibt die Verkürzung länger bestehen. Diese Stoffe diffundieren außerdem schneller, so daß der Spiegel im Innern rascher ansteigt und sich die Fasern, wenn auch langsamer als die äußeren, kontrahieren können. Die Kontraktionen addieren sich, die Verkürzung (bzw. Spannung) nimmt weiter zu.

Zusammenfassung.

Auf Grund verschiedener Diffusionsexperimente wird versucht, den Wirkungsmechanismus des in den Muskel beim Eintauchversuch eindringenden Acetylcholins zu klären. Es zeigt sich, daß bei allen Versuchen am Muskel sowohl wie an anderen Organen den Diffusionsverhältnissen bei der Beurteilung des Wirkungsmechanismus von Stoffen besonders Rechnung getragen werden muß, vor allem, wenn es sich um Substanzen und Wirkstoffe handelt, die vom Gewebe selbst abgebaut werden oder für die aus anderen Gründen besondere Diffusionsprobleme entstehen. Mancherlei Spekulationen und Hypothesen werden sich dann vielleicht erübrigen.

Literatur.

Bergold, G.: Z. Naturforschg **1**, 100 (1946). — Brecht, K., u. H. Feneis: Z. Biol. **103**, 355 (1950). — Krüger, P., u. H. Hanisch: Z. Biol. **103**, 127 (1950). — Riesser, O., u. Fr. Richter: Pflügers Arch. **207**, 287 (1925). — Rössel, W.: Pflügers Arch. **253**)., 224 (1951).

Professor Dr. K. Brecht, Tübingen, Physiologisches Institut, Silcherstr. 8.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 299—307 (1952).

Aus dem Pathophysiologischen Institut der Universität Pécs.

Über die Wirkung der Natriumsalze der Benzoe- und Salicylsäure, ihrer p-Aminoverbindungen und des Salicylamids auf den Sauerstoffverbrauch und die Körpertemperatur der Ratte.

Von

L. Balogh, Sz. Donhoffer, Gy. Mestyán, T. Pap und I. Tóth.

(Eingegangen am 30. Oktober 1951.)

Die stoffwechsel- und temperatursenkende Wirkung verschiedener Stoffe ist schon seit längerem bekannt. So wurde die temperatursenkende Wirkung des Pikrotoxins von Harnack und Schweghmann[1], die Verminderung des O_2-Verbrauches von Licht und Mitarbeitern[2, 3] beschrieben; Glaubach und Pick[4] berichteten über die Temperaturwirkung des Novocains und Issekutz und Kováry[5] fanden, daß dieses den Energiewechsel beträchtlich herabsetzt. Bekannt sind die Versuche Cushings[6–9], in welchen er die temperatur- und stoffwechselsenkende Wirkung von Hinterlappenextrakten bei intraventrikulärer Injektion nachwies. Cushing nahm als Erklärung eine direkte Einwirkung der Hinterlappenstoffe auf hypothalamische Mechanismen an. Neuerdings haben Donhoffer und Mitarbeiter[10–13] über eine akute temperatur- und stoffwechselsenkende Wirkung des Aminothiazols und des Methylthiouracils berichtet und gleichzeitig den Nachweis erbracht, daß es sich hierbei auch betreffs der Verminderung des O_2-Verbrauchs um eine Einwirkung auf hypothalamische Mechanismen handelt, indem nach bilateralen, elektrolytischen Hypothalamusläsionen die genannten Stoffe unwirksam befunden worden sind. Mestyán und Mitarbeiter[14–16] fanden, von diesen Versuchen ausgehend, daß einige Sulfonamide, sowie das Pyramidon den Energiewechsel der Ratte ebenfalls beträchtlich herabsetzen. All diese Untersuchungen ließen vermuten, daß wesentlich mehr Stoffe eine zur Herabsetzung des O_2-Verbrauchs führende akute Wirkung entfalten als ehedem angenommen wurde. Es schien daher angebracht, einige weitere Stoffe diesbezüglich zu untersuchen. Die temperatursenkende Wirkung des Natriumbenzoats ist bekannt, auch besitzt es nach Keeser[17] antithyreoidale Eigenschaften, und steht daher den bereits untersuchten Stoffen, wie auch die Paraaminobenzoesäure, besonders nahe. Der O_2-Verbrauch ist anscheinend nur bezüglich des Natriumsalicylats und des Salicylsäureamids untersucht worden. Rossier und Bühlmann[18] fanden kürzlich, daß Natriumsalicylat beim Menschen neben beträchtlicher Hyperventilation eine Stoffwechselsteigerung von 30—90% bewirkt, während dem Salicylsäureamid eine solche Wirkung nicht zukommt.

Versuchsanordnung. Der O_2-Verbrauch von normalen und schilddrüsenlosen männlichen Ratten wurde mittels des von Balogh[19] modifizierten Apparats von Belák und Illényi[20], wenn nicht anders angeführt bei 29,0—29,5° C, während 2—3 Perioden von je 15—20 min pro Stunde bestimmt. Die Temperatur wurde etwa stündlich rectal gemessen. Die Darreichung der untersuchten Substanzen

erfolgte subcutan. In Wasser unlösliche Stoffe wurden in der minimalen Menge NaOH gelöst.

Versuchsergebnisse.

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß Natriumbenzoat in den angewandten Mengen, von einem einzigen Versuch abgesehen, in allen Fällen einen beträchtlichen Abfall des O_2-Verbrauchs bewirkt. Dieser ist oft schon in der 1. Std offenkundig, erreicht gewöhnlich in der 3. Std den Tiefpunkt, und nach 5—6 Std, manchmal auch erst später, erreicht der Energiewechsel wieder den Ausgangswert. Die Senkung der Körpertemperatur überschritt nur in zwei der bei neutraler Temperatur ausgeführten Versuche 1,0° C. Diese verhältnismäßig geringe Senkung der Körpertemperatur gibt jedoch nicht getreu die Störung der Wärmeregulation wieder, da einerseits in einem bei 22° C unternommenen Versuch die Temperatursenkung 1,8° C betrug (Tab. 1, Vers. 9) und andererseits öfters kurze Zeit, nachdem die Tiere aus dem Behälter von 29° C entfernt wurden, bei Zimmertemperatur die rectalen Werte um 1,0—1,5° C niedriger waren als *sofort* nach der Herausnahme aus dem Behälter.

Im wesentlichen gleiche Ergebnisse wurden mit etwas größeren Gaben von Paraaminobenzoe-saurem Natrium erzielt, bloß kommt es zu einem etwas rascherem Abfall des O_2-Verbrauchs, und die Senkung der Körpertemperatur ist vielleicht weniger ausgesprochen. Ein nennenswerter Unterschied im Verhalten normaler und schilddrüsenloser Ratten ließ sich nicht feststellen.

Aus Tab. 2 geht die am Menschen beschriebene stoffwechselsteigernde Wirkung des Natriumsalicylats klar hervor. Die Körpertemperatur erfährt trotz einer bedeutenden Steigerung des Energiewechsels eine Verminderung oder bleibt unverändert.

Die Wirkung der Paraaminosalicylsäure (PAS) und des Salicylsäureamids unterscheidet sich auffallend von jener des Natriumsalicylats. Die Senkung der Körpertemperatur ist so nach PAS wie nach Salicylsäureamid recht ausgesprochen. Die Verminderung des O_2-Verbrauches tritt nach PAS regelmäßig ein, während sie nach Salicylsäureamid auch fehlen kann. Der O_2-Verbrauch erreicht nach PAS meistens schon während den ersten 2 Std den niedrigsten Wert und steigt dann allmählich zum Ausgangswert an. Es ist bemerkenswert, daß in einigen Versuchen (Tab. 3, Vers. 4 und 6) der O_2-Verbrauch extrem niedrige Werte erreicht. Der beobachtete Wert von 27 bzw. 29 cm^3 O_2 pro Quadratdezimeter und Stunde entspricht einer Grundumsatzverminderung von 61 bzw. 59%. Ähnliche oder noch kleinere Werte wurden nur nach Pyramidon und Aminothiazol an hypophysektomierten Ratten gefunden[16, 10].

Tabelle 1. *Die Wirkung von Natriumbenzoat und Paraaminobenzoe-saurem Natrium auf den O_2-Verbrauch und die Körpertemperatur der Ratte.* (N = normal, T = schilddrüsenlos).

Versuchs-Nr.	Nr. des Tieres und Körpergewicht	Vorperiode: O_2-Verbrauch in cm^3 O_2 pro dm^2 und Stunde	Vorperiode: Körpertemperatur °C	Dosis g Na-Benzoat in Vers. 1—9; Na-Aminobenzoat in Vers. 10—18	Nach subcutaner Injektion der untersuchten Substanz: 1. Std O_2-Verbrauch	1. Std Temp.	2. Std O_2-Verbrauch	2. Std Temp.	3. Std O_2-Verbrauch	3. Std Temp.	4. Std O_2-Verbrauch	4. Std Temp.	5. Std O_2-Verbrauch	5. Std Temp.	6.—10. Std O_2-Verbrauch	6.—10. Std Temp.	Maximale Senkung des O_2-Verbrauchs in %	Maximale Senkung der Körpertemp. in °C
1	319 T	53, 51,			46, 45,				41, 42,		49, 49		51, 51		53, 53			
	165 g	52, 52	36,0	0,08	44	35,6	—	—	43	35,0		35,1		—		35,6	21	1,0
2	305 N	77, 76,			70, 53		70, 65		53, 61				59, 59		65			
	190 g	77	37,2	0,12		36,5		—		36,7	—	—		—		36,8	31	0,7
3	303 N	64, 65,			65, 63,		57, 58,		52, 47,		52, 55		58, 57		60, 59,			
	170 g	64	37,0	0,10	63	37,0	52	36,0	47	35,5		36 3		36,4	64, 65	36,4	26	1,5
4	304 N	64, 64,			65, 64,		60, 60,		70, 66		65, 68				59, 63,			
	180 g	60, 64	36,2	0,12	65	36,2	63	36,0		35,5	65	36,0	—	—	60	36,4	0	0,7
5	307 N	64, 62,			47, 40,		45, 50,		49, 47,		46, 51				53, 53,			
	215 g	62	36,7	0,12	40	35,7	50	35,5	48	35,0		—	—	—	52	35,0	35	1,7
6	315 T	54, 53,			51, 49		46, 46		45, 43						56, 57,	36,0		
	240 g	53	36,0	0,08		35,8		—		35,0	—	—	—	—	52, 52	36,0	18	1,0
7	316 T	62, 59			46, 46,		47, 42,		40, 42,		43, 40,		45, 47,		49, 48,			
	115 g	59	36,0	0,08	44	35,9	40	35,5	41	35,5	43	—	43	36,0	48	36,5	33	0,5
8	143 N	62, 61,			57, 53		50, 49						57, 56,		58, 51,			
	190 g	62	36,8	0,10		—		36,2	—	—	—	—	55	36,2	53, 57	36,5	21	0,6
9*	148 N	109,			87, 83,		79, 75,		68, 71,		76, 87,		92,					
	170 g	115, 112	36,8	0,10	76	35,7	75	35,2	71	35,0	93	36,0	101, 107	36,0	—	—	40	1,8
10	325 T	51, 53,			49, 49		49, 48,		47, 50,		51, 51		53, 52,					
	165 g	52	35,8	0,12		35,0	48	35,2	54	—		35,2	51	35,5	—	—	9,6	0,8

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Versuchs-Nr.	Nr. des Tieres und Körpergewicht	Vorperiode		Dosis g Na-Benzoat in Vers. 1—9; Na-Aminobenzoat in Vers. 10—18	Nach subcutaner Injektion der untersuchten Substanz												Maximale Senkung des O_2-Verbrauchs in %	Maximale Senkung der Körpertemp. in °C
					1. Std		2. Std		3. Std		4. Std		5. Std		6.—10. Std			
		O_2-Verbrauch in cm^3 O_2 pro dm^2 und Stunde	Körpertemperatur °C		O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.		
11	325 T	50, 48,			48		44, 42		45, 46,		46, 46		48, 48					
	175 g	50	36,5	0,18		—		35,2	47	35,7		—		35,6	—	—	16	1,3
12	320 T	49, 49,			38, 38		37, 34,		32, 33		35, 37,		44, 42,		45, 49,			
	210 g	48	35,0	0,20		—	33	34,4		34,4	38	35,0	45	35,5	49	35,5	34	0,6
13	324 T	59, 58,			36, 40,		38, 40,		45, 48		49, 48,		53, 55					
	155 g	54	36,6	0,20	41, 45	36,1	40	36,3		36,5	53	36,6		36,6	—	—	37	0,5
14	321 T	43, 41,			41, 36		34, 31,		36				33, 31		40, 35,			
	170 g	42	35,7	0,20		35,4	31	35,2		—	—	—		35,2	41	35,4	26	0,5
15	306 N	64, 63,			66, 62,		64, 69,		69, 71		68, 66		68, 71					
	190 g	62	37,7	0,228	61	37,6	68	37,6		—		37,6		37,4	—	—	0	0
16	152 N	84, 86,			84, 66,		67, 66,				73, 69		73, 77					
	155 g	80, 84	37,3	0,20	60	36,7	64	37,2	—	—		—		37,4	—	—	22	0,6
17	154 N	78, 78,			77, 65,		67				67, 77		73, 72,					
	160 g	76, 77	37,4	0,17	67	36,5		—	—	—		37,4	76, 73	37,6	—	—	15	0,9
18*	315 T	52, 49,					39, 36,		37, 36,		39, 38		39		48, 47,			
	270 g	48	36,0	0,20	—	—	34	35,0	38	35,3		36,1		—	49, 47	36,6	32	1,0

* Versuchstemperatur 22° C.

Tabelle 2. *Die Wirkung des Natriumsalicylats auf den O_2-Verbrauch und die Körpertemperatur der Ratte.*
(N = normal, T = schilddrüsenlos.)

Vers.-Nr.	Nr. des Tieres u. Körpergewicht	Vorperiode		Dosis g	Nach subcutaner Injektion von Natriumsalicylat												Maximale Änderung des O_2-Verbrauchs in % des Ausgangswertes	Maximale Änderung der Körpertemperatur in ° C
					1. Std		2. Std		3. Std		4. Std		5. Std		6.—10. Std			
		O_2-Verbrauch in cm³ O_2 pro dm² u. Std	Körpertemp.		O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.		
1	321 T	44, 44,			50, 57		47, 43		45, 47		43, 42		43, 46,					
	165 g	43, 46, 43, 43	36,2	0,015		—		37,2		—		36,1	46	36,4	—	—	+ 30	0,1
2	153 N	77, 76,			84, 77		79		88, 82		76, 77							
	160 g	73, 73	37,2	0,03		—		37,2		37,0		37,0	—	—	—	—	+ 17	0,2
3	326 T	54, 50,			50, 52,		50, 49,		49, 51,		53, 55,		54, 50,					
	165 g	52, 56	37,3	0,02	45	37,0	48	36,6	51	37,0	51	37,1	49, 52	37,4	—	—	— 15	0,7
4	154 N	70, 67,			103,		84, 85		82		82, 78,		82, 77		72			
	160 g	69, 70, 70, 70	37,3	0,04	103, 92	37,2		—		37,4	83	37,8		—		37,6	+ 51	0
5	327 T	45, 40,			40, 66,		65, 70,		63, 64,		63, 60,		65, 63,		54, 52,			
	160 g	41, 44	37,0	0,035	63, 63	36,5	60	36,4	60	36,8	63	36,9	54	37,5	52	37,9	+ 66	— 0,6
6	155 N	70, 64,			98, 98,		100,		88, 88.		85		92, 89		77, 77,			
	140 g	66, 70	38,5	0,05	104	37,2	103,90	36,8	81	37,3		—		37,5	75, 78	36,9	+ 55	— 1,7
7	328 T	52, 52,			52, 44,		47, 51		53, 52		57, 56,		53, 54					
	160 g	52	37,2	0,027	45	36,5		—		36,3	57	36,5		37,0	—	—	— 13	— 0,9
8	152 N	66, 62,			70, 86,		86, 82		76, 74		76, 78		73		69, 70,			
	165 g	62	37,4	0,043	76	37,5		—		37,3		—		37,5	70	37,5	+ 36	0
9	329 T	42, 44,			51, 47,		51, 52		50		47, 46		46					
	220 g	44, 44, 44	36,1	0,04	49	36,1		—		36,4		—		36,5	—	—	+ 18	0

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

Vers.-Nr.	Nr. des Tieres u. Körpergewicht	Vorperiode: O_2-Verbrauch in cm^3 O_2 pro dm^2 u. Std	Vorperiode: Körpertemp.	Dosis g	Nach subcutaner Injektion von Natriumsalicylat: 1. Std O_2-Verbrauch	1. Std Temp.	2. Std O_2-Verbrauch	2. Std Temp.	3. Std O_2-Verbrauch	3. Std Temp.	4. Std O_2-Verbrauch	4. Std Temp.	5. Std O_2-Verbrauch	5. Std Temp.	6.—10. Std O_2-Verbrauch	6.—10. Std Temp.	Maximale Änderung des O_2-Verbrauchs in % des Ausgangswertes	Maximale Änderung der Körpertemperatur in ° C
10	326 T 160 g	41, 39, 41, 45, 43, 40	36,6	0,035	52, 47, 49	36,4	48, 47, 47	36,1	47, 44	—	48	36,3	47, 43	—	45, 47	36,2	+ 26	0
11	327 T 160 g	43, 42, 45, 45	37,2	0,04	49, 48, 50	—	49	36,5	48, 48, 47	35,7	49, 45, 47	36,1	47, 48	—	48, 49	36,6	+ 16	— 1,5
12	328 T 150 g	40, 38, 39, 39	36,8	0,05	43, 52 51	36,0	54, 54, 51	36,1	52, 52	—	53	36,1	44, 49, 46	36,5	41, 43, 39	36,5	+ 39	— 0,7
13	329 T 220 g	42, 44, 44, 45	36,5	0,06	44, 44, 44	36,2	47, 47	36,2	48, 48	—	48	36,4	47, 44, 45	36,5	—	—	+ 11	0
14	321 T 110 g	45, 41, 44	36,2	0,06	51, 50, 50	35,6	47, 46, 45	35,6	45, 44	35,4	45, 41	—	43, 42	35,9	—	—	+ 16	— 0,8
15	323 T 185 g	48, 48, 47	37,0	0,08	57, 61, 65	36,3	63, 61, 63	35,8	62, 62, 62	35,8	61, 59, 60	36,0	58, 58, 56	36,4	48, 48, 47	36,7	+ 35	— 1,2
16	324 T 160 g	39, 39, 41	36,6	0,08	45, 46, 45	35,6	47, 47, 48, 51	34,9	49, 48, 50	34,8	47, 46, 43	35,3	41, 44, 47	35,5	37, 38	37,7	+ 27	— 1,8
17	152 N 160 g	53, 53, 57	38,0	0,08	66, 81, 95	36,8	86, 96, 97	36,2	90, 90	36,8	86, 93, 95	37,7	90, 90, 93	37,6	90, 90, 85, 87, 86, 83, 86, 85, 84, 85, 86, 85,	37,8	+ 79	— 1,8

Versuchs-Nr.	Nr. der Ratte und Körpergewicht	Vorperiode		Dosis g p-Amidosalicyls. Na Vers. 1—8; Salicylamid Vers. 9—12	Nach subcutaner Injektion von PAS, bzw. Salicylsäureamid										Maximale Senkung des O_2-Verbrauchs in % des Ausgangswertes	Maximale Senkung der Körpertemperatur in °C
		O_2-Verbrauch in cm^3 O_2 pro dm^2 u. Std	Körpertemp.		1. Std		2. Std		3. Std		4. Std		5. Std			
					O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.	O_2-Verbrauch	Temp.		
1	322 T	46, 45,			45, 42,		33, 34		35, 36,		41, 40		45, 47,			
	235 g	50, 47	35,7	0,12	35	35,5		34,5	38	34,0		—	45	35,0	26	1,7
2	319 T	56, 58,			48, 44		44, 44		44		52, 61		56, 58			
	160 g	55	36,4	0,075		34,7		—		35,0		—		36,0	21	1,7
3	320 T	52, 56,			48, 42,		36, 39,		36, 36		36		40, 48,			
	210 g	53	35,5	0,14	36	33,5	36	34,0		—		34,1	52, 51, 51	35,0	33	2,0
4	320 T	51, 52,			29, 27,		28, 27,		32, 30		28, 34		38, 41,			
	215 g	51	36,6	0,14	28	34,2	27	34,7		35,4		36,0	40	36,9	47	2,4
5	148 N	83, 80,			70, 75		73, 70		69, 68		74		77, 74,			
	215 g	77	36,8	0,08		36,7		37,2		37,0		—	83	36,7	15	0,1
6	323 T	51, 50,			29, 34,		32, 37,		41		43, 38,		43, 51,			
	165 g	48, 48	36,9	0,14	30	34,9	36	34,7		—	37	36,2	53	36,9	41	2,2
7	151 N	70, 70,			62, 62,		48, 50		52, 52				77, 74			
	248 g	65	37,6	0,14	57	37,3		—		37,1	—	—		38,1	23	0,5
8	153 N	91, 94,			71, 68,		69, 71		75, 87		93, 89					
	165 g	91, 96, 89, 92	37,7	0,14	69	37,0		37,1		—		38,1	—	—	25	0,7
9	183 N	70, 67,			75, 74,		73, 72,		73, 70,		70, 70,					
	155 g	67, 67	37,4	0,10	74	35,8	70	35,7	72	36,5	68	36,7	—	—	0	1,6
10	185 N	65, 64,			63, 51,		47, 49,		44, 45,		46, 46,		55, 54			
	150 g	66	37,0	0,10	48	33,5	45	33,5	46	34,0	45	35,5		37,5	32	3,5
11	186 N	72, 69,			69, 64,		63, 59,		60, 65,		60, 61		65, 64			
	160 g	69	37,5	0,10	64	34,5	63	34,3	63	—		35,8		37,0	14	3,2
12	184 N	63, 59,			55, 56,		79, 80		84, 74,		63, 65,					
	155 g	61, 60, 65	37,6	0,10	55	33,5		34,3	73	37,5	64	37,7	—	—	11	4,0

Besprechung der Ergebnisse.

Mit Ausnahme des Natriumsalicylats üben also alle untersuchten Stoffe auf den Sauerstoffverbrauch und die Körpertemperatur eine ähnliche Wirkung aus wie das Pikrotoxin, Novocain, Aminothiazol oder Methylthiouracil. Auffallend ist der schroffe Gegensatz in der Wirkung des Natriumsalicylats und der PAS auf den Energiewechsel, die wohl nicht bloß mit der Hyperventilation bzw. deren Fehlen erklärt werden kann.

Eine eingehendere Analyse der Ergebnisse bestätigt die mittels antithyroidealen Stoffen gewonnene Erfahrung, daß sich die zentrale Steuerung des Wärmehaushalts und des Energiewechsels trotz ihrer vielfältigen engen Verbundenheit auch weitgehend unabhängig ändern kann und daß verschiedene Wirkstoffe oder auch dieselbe Substanz in verschiedenen Individuen die eine oder die andere in sehr verschiedenem Grade treffen können. So führt z. B. Natriumbenzoat zu einer recht bedeutenden Senkung des O_2-Verbrauchs (Tab. 1, Vers. 2, 7, 12), ohne daß diese von einem ausgesprochenem Temperatursturz begleitet wäre. Mit anderen Worten, die physikalische Wärmeregulation blieb verhältnismäßig intakt. Noch deutlicher ist diese Erscheinung bei der Anwendung von Paraaminobenzoat (Tab. 1, Vers. 12, 13, 14, 16, 18). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wird bei PAS und Salicylsäureamid die Senkung des O_2-Verbrauches durch einen ausgesprochenen Temperatursturz begleitet (Tab. 3). Von besonderem Interesse ist in dieser Hinsicht die Wirkung des Natriumsalicylats, bei welchem neben bedeutender Erhöhung des Energiewechsels ein ansehnlicher Abfall der Körpertemperatur eintreten kann (Tab. 2, Vers. 6, 17). Der eine, den erhöhten O_2-Verbrauch bedingende Faktor ist zweifellos die mit der Hyperventilation verbundene Muskelarbeit, doch reicht diese allein als Erklärung wohl nicht aus. Die Frage, ob die stoffwechselsteigernde Wirkung des Natriumsalicylats zum Teil auf einer — der Wirkung auf das Atemzentrum analogen — direkten Wirkung auf die den Energiewechsel regulierenden zentralen Mechanismen beruht, oder aber durch den thermosensiblen Apparat vermittelt wird, läßt sich nur in weiteren Versuchen klären.

Zusammenfassung.

Subcutane Injektion von Natriumbenzoat (0,08—0,12), von Paraaminobenzoe-saurem Natrium (0,10—0,20) und von Salicylsäureamid (0,10) bewirken neben Senkung der Körpertemperatur eine bedeutende Verminderung des O_2-Verbrauches der Ratte. Die Senkung der Körpertemperatur ist, verglichen mit der Abnahme des Energiewechsels, gering bei der Paraaminobenzoesäure und dem Natriumbenzoat, während sie bei Paraaminosalicylsäure und dem Salicylsäureamid bedeutend ist.

Natriumsalicylat (0,015—0,08) bewirkt bei unveränderter oder abnehmender Körpertemperatur einen starken Anstieg des O_2-Verbrauches, der wohl nur teilweise mit der durch Hyperventilation bedingten Muskelarbeit erklärt werden kann.

Literatur.

[1] Harnack, E., u. Fr. Schweghmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **40**, 151 (1898); **45**, 272 (1901). — [2] Rosenthal, F., H. Licht u. Fr. Lauterbach: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **106**, 233 (1925). — [3] Licht, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **121**, 320 (1927). — [4] Glaubach, S., u. E. P. Pick: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 537 (1935). — [5] Issekutz, B. sen., u. F. Kováry: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 156 (1940). — [6] Cushing, H.: Proc. Nat. Acad. U.S.A. **17**, 163 (1931). — [7] Cushing, H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **17**, 171 (1931). — [8] Cushing, H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **17**, 239 (1931). — [9] Cushing, H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **17**, 253 (1931). — [10] Balogh, L., I. Barka, Sz. Donhoffer, P. Jilly u. Gy. Mestyán: Kisérletes Orvostudomány **2**, 51 (1950). — [11] Balogh, L., I. Barka, Sz. Donhoffer, P. Jilly u. Gy. Mestyán: Kisérletes Orvostudomány **2**, 360 (1950). — [12] Balogh, L., I. Barka, Sz. Donhoffer, P. Jilly u. Gy. Mestyán: Kisérletes Orvostudomány **3**, 179 (1951). — [13] Donhoffer, Sz., Gy. Mestyán u. L. Balogh: Nature **166**, 737 (1950). — [14] Mestyán, Gy., u. I. Barka: Orv. Hetil. (ung.) **91**, 1010 (1950). — [15] Mestyán, Gy., T. Pap u. L. Nagy: Klin. Wschr. **29**, 512 (1951). — [16] Mestyán, Gy., I. Barka u. L. Nagy: Kisérletes Orvostudomány **3**, 165 (1951). — [17] Keeser, E.: Klin. Wschr. **28**, 494 (1950). — [18] Rossier, P. H., A. Bühlmann: Helv. Med. Acta **17**, 651 (1950). — [19] Balogh, L.: Experientia **7**, 68 (1951). — [20] Belák, S., u. A. Illényi: Biochem. Z. **281**, 27 (1935).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 308—315 (1952).

Aus dem Max Planck-Institut für Biophysik (Direktor: Prof. Dr. B. Rajewsky) und der 1. Medizinischen Klinik der Universität Frankfurt a. M. (Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. W. Hauss).

Morphologische Veränderungen der Erythrocyten bei der Hypotoniehämolyse.

Von

O. Hug, W. Lippert und P. Moser.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. August 1951.)

Die bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen schienen die alte Streitfrage um die Struktur der roten Blutzelle entschieden zu haben. Das Bild einer allseits geschlossenen, meist faltig zusammengefallenen Hülle, wie es das hämolysierte Blutkörperchen im Elektronenmikroskop gibt, wird als Beweis dafür angesehen, daß auch der im Blut kreisende Erythrocyt aus einem löslichen Hämoglobinkern und einer membranartigen Außenschicht besteht. Diese soll während der Hämolyse weitgehend unverändert bleiben. Zufällige Risse in dem auf der Folie aufgetrockneten Blutschatten gelten als besonders sinnfälliges Argument für die natürliche Existenz einer „Ballonhülle", also einer „Membran im Sinne streng cytologischer Definition" [10,12,13]. Im einzelnen gehen zwar die Vorstellungen über den feineren Aufbau dieser Hülle und ihres Übergangs in den Hämoglobinkern auseinander, aber gemeinsam ist allen Ansichten die mehr oder weniger deutlich ausgesprochene Annahme einer mechanisch festen, unter Umständen dehnbaren Haut.

Im folgenden wird über Beobachtungen berichtet, die zu einer vorsichtigeren Deutung des im Elektronenmikroskop abgebildeten Hämolyserestes führen. Dabei ist besonders das Verhalten unreifer Blutzellen (Retikulocyten) während der Hämolyse aufschlußreich.

Jung und Jung u. Asen[11] haben das elektronenmikroskopische Bild von Retikulocyten beschrieben, das durch Substanzanhäufungen im Zellinneren ausgezeichnet ist. Sie sahen, daß solche Verdichtungen im Zentrum mitunter aufgehellt sein können, und außerdem stellten sie fest, daß den Blutzellen des öfteren — namentlich bei Ratten und Meerschweinchen — kleine Membranbläschen anhaften. Während unserer Arbeit wurde uns dann eine Veröffentlichung von Bernhard, Braunsteiner und Mangini[1] zugänglich, in der die Bildung von Bläschen an den Zellhüllen hämolysierter Retikulocyten elektronenmikroskopisch dargestellt und ihre Entstehung aus der Substantia granulofilamentosa unter Wassereinwirkung angenommen wird. Inzwischen haben auch Nauck, Peters und Wigand im Zusammenhang mit ihren Bartonellenstudien ähnliche Beobachtungen gemacht[15, 16]. Die kombinierte licht- und elektronenoptische Untersuchung hat uns in der gleichen Zeit Aufschluß über den Entstehungsmechanismus dieser Bläschen gebracht.

Hämolysiert man natives defibriniertes oder mit Citrat versetztes, *an Retikulocyten reiches* Blut unter dem Deckglas bei Phasenkontrastbeobachtung, so werden mit dem Einsetzen der Hämolyse gegen Wasser und beim Abblassen der mäßig angeschwollenen Erythrocyten in einer gewissen Anzahl von Zellen dunkle Körperchen sichtbar, die entweder in der Zellperipherie sitzen oder im Inneren der hämolysierenden Zelle in immer lebhafter werdende Brownsche Bewegung geraten. Einzelne

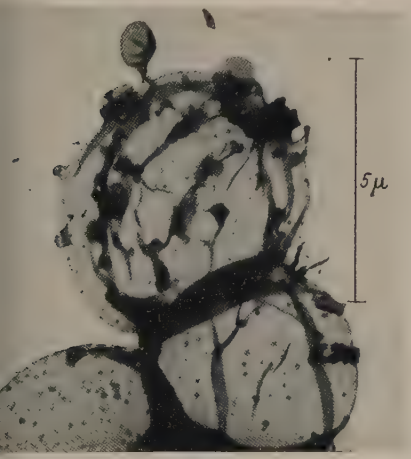


Abb. 1.

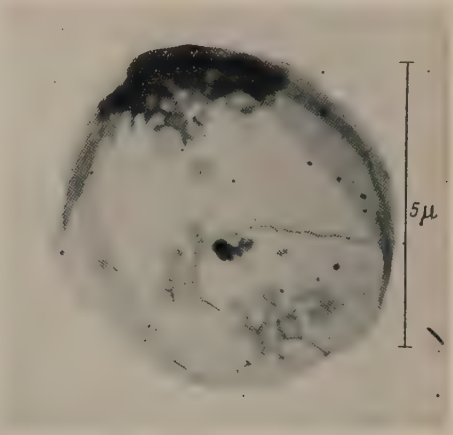


Abb. 2.

Abb. 1. Kaninchenretikulocyt, provoziert durch wiederholte Blutentnahme, 30 min in dest. Wasser hämolysiert, osmiumfixiert. Körnig-fleckige Substanzanhäufungen, Bläschenbildung, Abschnürung von Bläschen. El.-opt. Vergr.: 3800fach.

Abb. 2. Menschlicher Retikulocyt, 20 min hämolysiert, osmiumfixiert. Verschiedene Formen fleckiger Stromaverdichtungen und Bläschen. El.-opt. Vergr.: 4400fach.

Körnchen lösen sich von der Zelloberfläche ab. Gleichzeitig treten, unregelmäßig über den Zellschatten verstreut, feinste, eben noch sichtbare (bei Betrachtung im gewöhnlichen Mikroskop unsichtbare) Bläschen auf. Diese entstehen zum Teil durch Quellung der feinen Körnchen oder entwickeln sich exzentrisch aus ihnen, zum anderen Teil aber treten sie an Stellen auf, wo vorher keine granulären Elemente sichtbar waren. Mit der Dauer der Wassereinwirkung werden die Bläschen zahlreicher und größer und lösen sich zum Teil von der Zelloberfläche. Diese verschiedenen Phasen einer Hämo- und Stromatolyse konnten durch Zusatz von Osmiumsäure fixiert werden. Abb. 1 zeigt am Kaninchenretikulocyten schattendichte, fleckig-körnige Substanzanhäufungen und daneben Bläschen, welche sich zum Teil sicher aus dieser Substanz entwickeln. Ein ähnliches, wenn auch in den Einzelheiten der Feinstruktur und der Bläschenanordnung verschiedenes Bild geben menschliche Retikulocyten, wie wir sie bei Blutungsanämien,

bei Perniciosa im Stadium der Remission, bei chronischen hämolytischen Anämien und bei toxischer Anämie nach Verbrennung untersucht haben. Nur selten, nach kurzfristiger Hämolyse, ist die schattengebende Substanz ähnlich verteilt wie im supravitalgefärbten Präparat. In Abb. 2 und Abb. 7b der Veröffentlichung[6] ist die fast völlige Umwandlung in Bläschen festgehalten.

Die Zahl der Zellen, welche nach kurzfristiger Hämolyse im Phasenkontrastmikroskop mit Körnchen behaftet sind, entspricht der mit der Supravitalfärbung durch Brillantkresylblau festgestellten Zahl der Retikulocyten, wie dies schon Brecher[2] überprüft hat. Eine Retikulocytenzählung mit Einteilung in 4 Gruppen je nach der Menge retikulärer Substanz (Heilmeyer und Westhäuser[5]) ist infolge der während der Hämolyse einsetzenden Schwellung und Ablösung der Substanz nicht exakt möglich.

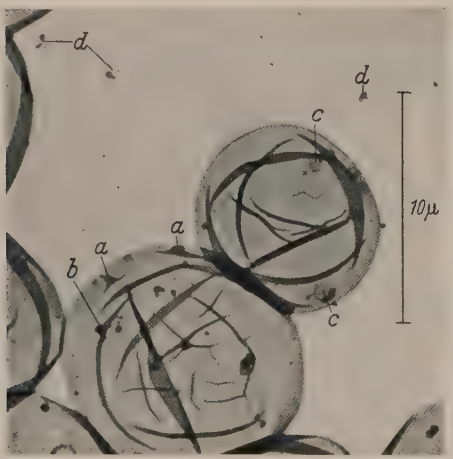


Abb. 3. Erythrocyten von gesunder Versuchsperson, 15 min hämolysiert, osmiumfixiert. Feinzipfelige Ausstülpungen (*a*), einzelne Fleckchen (*b*) und Bläschen (*c*), freischwimmende Bläschen und Körnchen (*d*). El.-opt. Vergr.: 3000fach.

Die wichtige Frage, ob diese Granuala, aus denen Bläschen hervorgehen, präformierte Gebilde des intakten Retikulocyten sind, können wir nicht sicher beantworten, da die Körnchen erst während des Hämoglobinaustritts und der damit verbundenen Aufhellung der Zelle sichtbar werden. Die Verteilung der Körnchen und Flecken scheint uns eher für zufällige Zusammenballungen zu sprechen. In stereoskopischen Aufnahmen, wir wie sie auf dem Internationalen Kongreß für Elektronenmikroskopie in Paris, 1950, demonstrieren konnten, ist außerdem zu sehen, daß die Verdichtungen keine scharfen Konturen haben, sondern verwaschen in den übrigen Stromaschatten übergehen. Bemerkenswert ist ferner, daß die sich an der Oberfläche abhebenden und zum Teil abschnürenden oder bereits abgelösten und dann frei in der Suspension schwimmenden Bläschen nach längerer Wassereinwirkung im Endzustand der Schwellung meist den gleichen elektronenoptischen Kontrast geben wie das Stroma der Zelle. Da indessen der Durchmesser der Bläschen sehr variiert (zwischen 0,1 und 1,5 μ), ist es unwahrscheinlich, daß sie sich alle aus präformierten Elementen bestimmter Größe durch Schwellung entwickeln.

Der nach der Hämolyse zurückbleibende Rest der *unreifen* Blutzellen besteht also aus einem Material, das sich unter der Einwirkung

des Wassers an umschriebenen Stellen zusammenballt, starke Quellfähigkeit zeigt und die Neigung zu bläschenförmiger Zerteilung hat. Er verhält sich in dieser Hinsicht wie das cytoplasmatische Material anderer Körperzellen. Hug und Lippert haben in einer vorhergegangenen Arbeit[6] dieses Verhalten cytoplasmatischen Materials an verschiedenen tierischen Zellen beschrieben. Wir nehmen an, daß diese cytoplasmatische Restsubstanz im ungeschädigten Retikulocyten diffus, aber mit Bevorzugung der oberflächennahen Zonen verteilt ist. Die Phasenkontrastbeobachtung während der Hämo- und Plasmolyse macht es wahrscheinlich, daß die granulären Zusammenballungen bereits Kunstprodukte sind, wie dies auch für die supravitalgefärbte netzförmig verteilte Substanz anzunehmen ist.

Im *reifen* menschlichen Erythrocyten ist mit Supravitalfärbung durch Brillantkresylblau keine basophile Substanz darstellbar. Bei Phasenkontrastbeobachtung reifer Erythrocyten während der Hämolyse sind granuläre oder bläschenförmige Elemente mitunter zu beobachten. Elektronenoptisch findet man dagegen immer wieder vereinzelt kleinfleckige Verdichtungen, wie dies Lindemann[13] beschreibt. Auch diese können nun bei weiterer Wassereinwirkung zu feinen Bläschen aufquellen (Abb. 3). Es kann sein, daß es sich bei einzelnen dieser Blutzellen um ausreifende Retikulocyten handelt, welche im Lichtmikroskop auch nach Anfärbung nicht mehr faßbar sind. Offenbar aber können solche Bläschen auch an völlig ausgereiften Erythrocyten auftreten. So findet man häufig Bläschen an der Zelloberfläche, wenn die Erythrocyten vor der Hämolyse unter der Einwirkung des künstlichen Milieus Stechapfelform angenommen haben. Es kommt dabei nicht nur zu einer zipfeligen Ausziehung der Oberfläche, sondern zu einer tropfenförmigen Substanzanhäufung an den Enden der Zipfel, die sich dann während der Hämolyse in Bläschen umwandeln und ablösen kann.

Sehr auffällig ist dieser Vorgang bei Rindererythrocyten, die aus der Stechapfelform heraus hämolysiert wurden, und bei denen man den Eindruck hat, daß das Stroma wie eine zähflüssige Masse in Fäden von den ausgezogenen Spitzen abläuft und dann in Bläschenketten umgewandelt wird (Abb. 5).

Im Hämolysat — auch des normalen Blutes – schwimmen oft einzelne feine Bläschen. Wenn die Erythrocyten vor der Aufarbeitung nicht durch wiederholtes Waschen und Zentrifugieren von den anderen Blutzellen getrennt werden, kann oft nicht mit Sicherheit ausgemacht werden, von welchen plasmolysierten Gebilden diese Bläschen abstammen. Sie können sich an die Oberfläche einer Erythrocytenhülle anlagern und eine Abkunft von dieser vortäuschen (Abb. 4).

Nur wegen der Ähnlichkeit im elektronenmikroskopischen Bild sei darauf hingewiesen, daß auch an chemisch alterierten Erythrocyten fleckförmige Veränderungen und Bläschen auftreten können.

Gewisse Blutgifte können, wie Jung[9] an zahlreichen experimentellen Beispielen und Moser und Krause[14] am speziellen Fall der Sulfonamidvergiftung gezeigt haben, zu örtlichen Anreicherungen kontrastgebender Substanz am Erythrocyten führen. Als Beispiel sei die Phenylhydrazinvergiftung angeführt, wobei jedoch nur auf gewisse morphologische Phänomene und nicht auf den chemischen Mechanismus eingegangen sei. Phenylhydrazin schädigt die Erythrocyten in vivo und in vitro so,

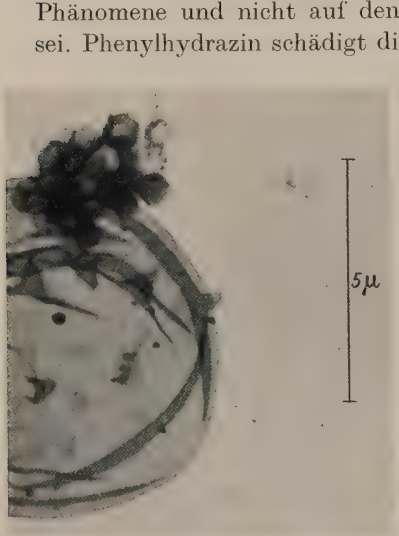


Abb. 4.

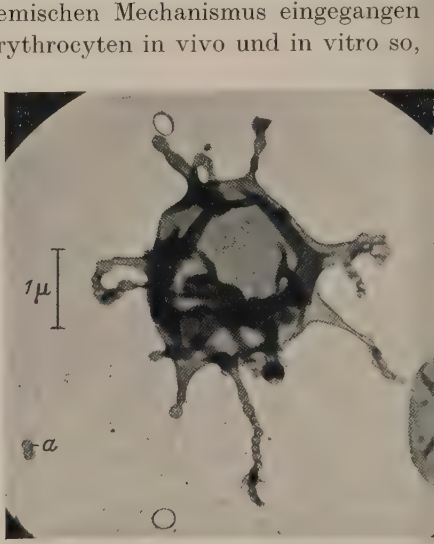


Abb. 5.

Abb. 4. Erythrocyt von gesunder Versuchsperson, 15 min hämolysiert, osmiumfixiert. Stechapfelform. Anlagerung traubenförmiger Konglomerate von Bläschen cytoplasmatischer Substanz unbekannter Herkunft. El.-opt. Vergr.: 4400fach.

Abb. 5. Rindererythrocyt (Stechapfelform), 20 min hämolysiert, osmiumfixiert. Starke Verkleinerung des Zelleibes, zipfelige Ausziehung des Stromas mit Bläschenketten. Einzelne abgelöste Bläschen (*a*). El.-opt. Vergr.: 10200fach.

daß diese nach Supravitalfärbung mit Brillantkresylblau eine der Substantia granulofilamentosa der Retikulocyten sehr ähnliche basophile Zeichnung aufweisen. Im weiteren kann es in vivo zur Bildung von Heinz-Körperchen kommen. Im Phasenkontrastmikroskop granuliert sich die Oberfläche der Erythrocyten bei Zusatz von Phenylhydrazin und anschließender Wasserhämolyse, und einzelne feine Körnchen und Tröpfchen lösen sich dann von der Oberfläche ab. Stärkere Konzentrationen des Stoffes erzeugen fleckförmige Koagula, wie sie Jung[8] publiziert hat, und auf deren Abbildung verzichtet wird. Bei schwächerer Einwirkung des Giftes und anschließender Hämolyse sind jedoch neben den spärlicheren Granula deutliche Bläschen zu beobachten, ohne daß jedoch dabei, wie bei den Retikulocyten, die Entwicklung der Bläschen aus den Granula im Phasenkontrastmikroskop verfolgt werden konnte. Setzt man Phenylhydrazin den vorher gegen Wasser hämolysierten

Erythrocyten zu, so vermißt man elektronenoptisch grobe, stark schattengebende Granula, findet aber neben zahlreichen feinen Flecken Bläschen ähnlicher Art, wie am hämoglobinhaltigen Erythrocyten. Abb. 6 wurde dadurch gewonnen, daß die Blutschatten eines Tropfens hämolysierten Nativblutes mehrfach gewaschen, in 1 cm³ destillierten Wassers suspendiert, mit einem Tropfen Phenylhydrazinchloridlösung (1,0 mg/100 cm³ physiolog. NaCl) versetzt und nach 10 min mit Osmiumsäure

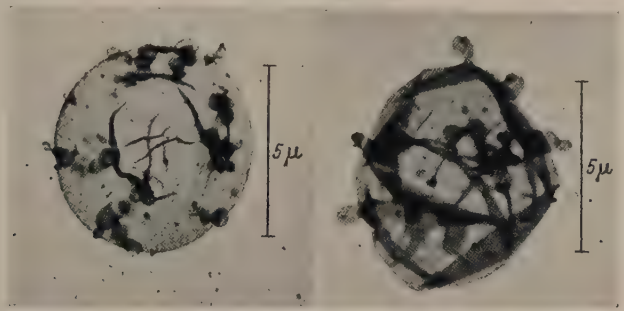


Abb. 6. Menschliche Erythrocyten normaler Versuchsperson. 15 min in dest. Wasser hämolysiert, 2mal gewaschen und zentrifugiert. Hämolyserest eines Bluttropfens in 1 cm³ Wasser suspendiert, mit 1 Tropfen einer Lösung von 1 mg Phenylhydrazin in 100 cm³ aqua dest. versetzt, nach 10 min osmiumfixiert. Feinere und gröbere Koagula, zipfelige Ausziehungen, Bläschen. El.-opt. Vergr.: 3800fach.

fixiert wurden. Somit ist es sicher, daß Phenylhydrazin nicht nur am Hämoglobin angreift, sondern auch den Nichthämoglobin-Anteil der Erythrocyten verändert.

Aus diesen Beobachtungen leiten wir die Vorstellung ab, daß auch das Stroma des reifen Erythrocyten aus einem Rest der quellfähigen Substanz besteht, aus dem sich das Stroma des Retikulocyten aufbaut. Ob diese Substanz nur eine Hüllschicht bildet oder sich doch mehr oder weniger weit als lockeres Netzwerk in den Hämoglobinkern hinein fortsetzt, kann aus dem Verhalten des Hämolyserestes nicht abgelesen werden. Bei Beginn der Hämolyse kommt es durch Wasseraufnahme zur Volumenvergrößerung der Zelle, bis der gelöste Blutfarbstoff austritt. Hierbei erreicht die Zelle nahezu Kugelform. Gleichzeitig entsteht durch Ausfällung der unlöslichen Bestandteile in der Grenzschicht eine dünne Haut (die im übrigen nach der Trocknung der Suspension auch schon im Phasenkontrastmikroskop mit ihren Falten erkennbar ist). War vorher bereits reichlich quellfähige Substanz vorhanden, wie im Reticulocyten, oder reichert sich diese durch eine physikalisch-chemische Einwirkung vor oder unter der Hämolyse an bestimmten Stellen an, wie bei der Stechapfelform, so können sich hier Bläschen entwickeln. Die Bläschenbildung ist demnach kein spezifisches Phänomen der Retikulocyten, sondern ist bei diesen nur entsprechend der größeren Menge quellfähiger

Substanz ausgeprägter. Die Ablösung von Tröpfchen und Bläschen erinnert an andere bereits bekannte Substanzverluste der Erythrocyten, so an die Bildung von Blutfäden[4,7,9,18,19] und an den antisphärischen Faktor Ponders[17], dessen Verlust zur Stechapfelbildung und Abkugelung führen soll. Bei solchen Vorgängen wird die Ablösung einer äußeren Stoffschicht von dem darunterliegenden Stroma angenommen. An der Bläschenbildung der Reticulocyten scheint das gleiche Material beteiligt zu sein, aus dem ihr übriger Hämolyserest aufgebaut ist. Kontrastunterschiede zwischen diesem und den Bläschen sind elektronenoptisch nicht zu erkennen. Auch bei den abgebildeten Rindererythrocyten hat man den Eindruck, daß sich die Bläschenketten auf Kosten des Stromas bilden, da der Durchmesser des Blutschattens mit der Stechapfelbildung erheblich abnimmt.

Das Stroma des reifen Erythrocyten besitzt wie das der Retikulocyten eine gewisse Zerfließlichkeit und Plastizität und gleicht darin, ebenso wie hinsichtlich der Quellfähigkeit und Membranbildung, dem Cytoplasma anderer tierischer Zellen. Über den feineren Aufbau des Stromas und seine chemischen Eigenschaften kann auf Grund unserer Beobachtungen jedoch nichts ausgesagt werden. Insbesondere die Beteiligung der Lipoide am Aufbau der Grenzschicht, die möglicherweise den Erythrocyten wesentlich von anderen Zellen unterscheidet, bleibt dabei ungeklärt. Mit den verschiedenen Modellen der Erythrocytenhüllschicht, wie sie von Wolpers[20,22], Bungenberg de Jong und Winkler[3] und Ponder[17] angegeben wurden, stehen die Beobachtungen nicht im Widerspruch; sie bieten aber auch keine Stütze für die Richtigkeit der einen oder anderen Hypothese. Immerhin geben sie Veranlassung, nicht mit einer stabilen, unveränderlichen Textur der Grenzschichten, sondern mit einer labilen, vom Milieu und vom Funktionszustand der Zelle beeinflußten Anordnung der submikroskopischen Bausteine in den Grenzschichten zu rechnen.

Zusammenfassung.

Die elektronenmikroskopisch darstellbare Erythrocytenmembran ist eine Niederschlagsmembran, die während der Hypotoniehämolyse und der anschließenden Trocknung und Fixierung aus den unlöslichen Bestandteilen der Zelle entsteht. Das quellfähige, membranbildende Material verhält sich dabei wie die cytoplasmatische Substanz anderer tierischer Zellen.

Lokale Anhäufungen der quellfähigen Substanz der Erythrocyten können während der Hämolyse in bläschenförmige Gebilde umgewandelt werden. An Retikulocyten wird mittels Phasenkontrast- und Elektronenmikroskop die artificielle Entstehung solcher Bläschen aus cytoplasmatischer Substanz verfolgt.

Auch nach Phenylhydrazineinwirkung auf reife Blutzellen kommt es zu fleckförmigen Verdichtungen und zu Bläschenbildungen an der Zelloberfläche. Ähnliche Veränderungen lassen sich an den durch Hypotoniehämolyse gewonnenen Blutschatten mit Phenylhydrazin erzeugen.

Die Beobachtungen sind nicht mit der Annahme einer starren Zellmembran vereinbar.

Literatur.

[1] Bernhard, W., H. Braunsteiner et H. Mangini: C. r. Soc. Biol. Paris **143**, 1513 (1949). — [2] Brecher, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **49**, 89 (1948). — [3] Bungenberg de Jong, H. G., u. K. C. Winkler: Arch. néerl. Physiol. **25**, 431 (1940). — [4] Ham, Th. H., Shu Chu Shen, El. M. Fleming and W. B. Castle: Blood, III, 373 (1948). — [5] Heilmeyer, L., u. R. Westhäuser: Z. klin. Med. **121**, 361 (1932). — [6] Hug, O., u. W. Lippert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 395 (1951). — [7] Jung, F.: Klin. Wschr. **21**, 917 (1942). — [8] Jung, F.: Klin. Wschr. **24/25**, 459 (1947). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **208**, 20 (1949). — [9] Jung, F.: Klin. Wschr. **27**, 232 (1949). — [10] Jung, F.: Naturwiss. **37**, 229 u. 254 (1950). — [11] Jung, F., u. H. Asen: Klin. Wschr. **23**, 115 (1944). — [12] Lindemann, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 197, 220 u. 439 (1949). — [13] Lindemann, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 569 (1949). — [14] Moser, P., u. P. Krause: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 468 (1950). — [15] Nauck, E. G., D. Peters u. R. Wigand: Z. Naturforsch. **5b**, 259 (1950). — [16] Peters, D., u. R. Wigand: Klin. Wschr. **28**, 649 (1950). — [17] Ponder, E.: Hemolysis and Related Phenomena. New York, Grune a. Strattun, 1948. — [18] Schümmelfelder, W.: Diss. Münster, 1947. — [19] Schümmelfelder, N., u. W. Schümmelfelder: Klin. Wschr. **26**, 303 (1948). — [20] Wolpers, C.: Naturwiss. **29**, 416 (1941). — [21] Wolpers, C.: Klin. Wschr. **21**, 1049 (1942). — [22] Wolpers, C., u. K. Zwickau: Fol. haemat. (Lpz.) **66**, 211 (1942).

Dr. O. Hug, Frankfurt a. M.-Süd, Forsthausstr. 70,
Max Planck-Institut für Biophysik.

Arch. exper. Path. u. Parmakol., Bd. 214, S. 316—332 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens).

Über die Beeinflussung der lokalen Erfrierung durch allgemeine Vorbehandlung mit einem Antihistaminicum (Versuche am Kaninchenohr)*.

Von
Gerhard Zetler**.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. August 1951.)

Siegmund[1] betonte als erster die Bedeutung humoraler Vorgänge für das Zustandekommen des Gewebsunterganges nach lokaler Erfrierung und nahm an, daß sich während der Kälteeinwirkung im betroffenen Gewebe ein Erstickungsstoffwechsel ausbildet, durch den biogene Amine in Freiheit gesetzt würden; diese Stoffwechselprodukte sollten im Verein mit der gleichzeitigen Schädigung der Kolloide (nach Schade[2] „Gelose") zur Dysorie und damit zum Gewebsuntergang und zu pathologisch-anatomischen Spätschädigungen führen. Ferner räumte Siegmund als erster intravasalen Gerinnungsvorgängen und thrombotischen Erscheinungen eine Bedeutung ein und sprach von thrombotischer Angiopathie (Schürmann). Die Ansichten Siegmunds wurden bestätigt durch den Nachweis von Histamin in Erfrierungsblasen (Loos[3]) und eines erhöhten Histaminspiegels im Blut nach Erfrierung (Ziemke[4]), ferner durch die Beobachtung einer bedeutend verstärkten Gerinnungsneigung des Blutes des *ganzen* Körpers nach *lokaler* Erfrierung (Kahmann[5]). Auch in diesen Punkten und nicht nur in klinischer Hinsicht zeigen die Verbrennungen bemerkenswerte Parallelen zu den Erfrierungen, da auch nach Verbrühungen und Verbrennungen Histamin im Blute vermehrt ist (Barsoum und Gaddum[6]; Kisima[7]; Loos[8]) und das Blut schneller als normal gerinnt (Ewig[9]). Die in beiden Fällen beschleunigte Blutgerinnung dürfte durch das Einströmen von Histamin aus den geschädigten Gewebsbezirken ins Blut bewirkt werden, da wir zeigen konnten (Zetler[10]), daß beim Kaninchen parenterale Gaben von Histamin in Abhängigkeit von der Dosis die Blutgerinnungszeit verkürzen, und zwar durch ein direktes Eingreifen in den Mechanismus der

* Einen kurzen Überblick über unsere Versuchsergebnisse veröffentlichten wir an anderer Stelle [Naturwissenschaften **38**, 286 (1951)].

** A. Bargmann wird die Ergebnisse ausführlich darstellen (Dissertation, Kiel; noch unveröffentlicht).

Blutgerinnung. Da auch diese Histaminwirkung durch die Antihistaminica, die selbst die Blutgerinnung verzögern, abgeschwächt oder aufgehoben wird (ZETLER[10]), unternahmen wir Versuche am Kaninchen mit folgender Fragestellung: *Kann die Blutgerinnungsbeschleunigung nach lokaler Kälteschädigung durch Antihistaminica vermindert oder aufgehoben werden, und wie werden im positiven Falle gleichzeitig die klinischen Erscheinungen an der gefrorenen Stelle beeinflußt?*

Methodik.

Beide Ohren erwachsener Kaninchen wurden am Tage vor dem Versuch mittels BaS enthaart, ein Ohr wurde gefroren, aus der Randvene des anderen Ohres wurden die Blutproben entnommen. Wie auch in der erwähnten Histaminarbeit verwandten wir zur Messung der Blutgerinnungszeit (BGZ) die bekannte BÜRKERsche Methode, die sich nach Übung angesichts der ausgiebigen Änderungen der BGZ als ausreichend genau erwies. Die Ohren froren wir mit CO_2-Schnee nach orientierenden Vorversuchen 1,5 min lang in einer Fläche von 8,0 cm^2 im oberen Drittel des Ohres, und zwar so, daß die Zentralarterie mitten durch die Frierstelle lief. Der CO_2-Schnee wurde in einem Porzellantiegel entsprechender Größe geformt und leicht auf das Ohr aufgedrückt; zwischen Ohr und CO_2-Schnee lag eine dünne Stanniolfolie, um eine Einwirkung von CO_2 auf das Gewebe zu vermeiden. Vor dem Frieren und in einheitlichen Zeitabständen danach wurden die BGZ ermittelt und folgende Beobachtungen an der Frierstelle angestellt:

1. Das lokale Ödem an der Frierstelle wurde durch Dickenmessung dieses Bezirkes vor und nach dem Frieren erfaßt. Dazu wurde das Ohr auf eine feste Unterlage gelegt und mit einer konstanten Belastung von 1,0 g ein Hebelsystem aufgesetzt, das durch eine Übertragung im Verhältnis von 1 : 10 0,05 mm abzulesen gestattete.

2. Das kollaterale Ödem teilten wir in folgende 4 Grade ein: 0: kein kollaterales Ödem, 1: Ödem des oberen Drittels des Ohres, 2: Ödem des oberen und mittleren Drittels, 3: Ödem des ganzen Ohres.

3. Die Blasenbildung an der Frierstelle ließ sich in 4 Grade einstufen: 0: keine Blasen, 1: geringe Blasenbildung = einige kleine (stecknadelkopfgroße) Bläschen, 2: mittelstarke Blasenbildung = 1—2 erbsengroße Blasen oder mehrere kleine Bläschen, 3: starke Blasenbildung = eine bis mehrere daumennagelgroße Blasen.

4. Die Größe der Defekte und der Narbenbezirke, in denen sie lagen, wurde sofort nach der Demarkation mittels Durchpausen auf Transparentpapier erfaßt und danach mit einem Polarplanimeter ausgemessen.

5. Die Dauer des Demarkationsprozesses wurde genau beobachtet.

In einer Reihe von Fällen wurden die gefrorenen Ohren nach vollendeter Demarkation in Lokalanästhesie für histologische Zwecke abgetrennt. Die Anfertigung der histologischen Schnitte sowie der Mikrophotogramme besorgte in dankenswerter Weise Herr Dr. W. HILD vom Anatomischen Institut der Universität Kiel.

Die statistisch verwerteten Versuche umfassen 20 Kaninchen, von denen 10 25 min vor dem Frieren 45 mg/kg Antistin* intramuskulär injiziert erhielten. Wegen des geringen Umfangs der beiden miteinander zu vergleichenden Kollektive nahmen wir die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse nach der

* Warenzeichen der Firma Ciba-AG. für 2-(N′-Phenyl-N′-benzylaminomethyl)-imidazolin. Wir danken der Firma für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen dieses Antihistaminicums.

Methode von Student (Hosemann[11], Weber[12]) vor, deren Wesen darin besteht, daß mit abnehmendem Umfang der Kollektive die statistischen Anforderungen bei der Bewertung der Ergebnisse gesetzmäßig steigen. In unseren Tabellen bezeichneten wir mit σ_x die „Mittlere Abweichung der Einzelbeobachtung", mit ε_x den „Mittleren Fehler des Mittelwertes", aus dem der „Mittlere Fehler der Differenz beider Mittelwerte" σ_{Diff} errechnet wird. Die Differenz der beiden zu vergleichenden Mittelwerte wird durch σ_{Diff} dividiert, wodurch sich t_{Diff} ergibt. t_{Diff} muß bei vorliegender Signifikanz des beobachteten Unterschiedes gleich groß oder größer sein als der dem Freiheitsgrad des Untersuchungsmaterials entsprechende t-Wert in der Tabelle von Student; dieser t-Wert (in unserem Falle 3,5) ist das 3σ-Äquivalent für den Mittleren Fehler des Mittelwertes bei kleinem n und garantiert somit eine Sicherheitsgrenze von 0,27%. Der jeweils in Frage kommende Freiheitsgrad des Materials wird nach der Formel $n_f = n_1 + n_2 - 1$ berechnet (in unserem Falle $n_f = 19$). Für unsere Zwecke erlaubten wir uns noch folgende Formulierung für die Signifikanz eines Ergebnisses:

$$Q_{\text{Diff}} = \frac{t_{\text{Diff}}\,(\text{gefunden})}{t_{\text{Diff}}\,(\text{gefordert})}$$

Nach dieser Formel liegt entsprechend dem oben Gesagten dann Signifikanz vor wenn $Q_{\text{Diff}} \geqq 1{,}0$ ist. — Im allgemeinen hielten wir uns an die in der Statistik gebräuchliche Bewertung der Ergebnisse, d. h. es wurde der Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Messungsreihen dann als weitgehend sicher angesehen, wenn die statistischen Bedingungen für die Sicherheitsgrenze $p = 0{,}27\%$ erfüllt waren. Wir verwerteten jedoch auch noch ein Ergebnis (Dauer bis zur Demarkation), das erst für $p = 2{,}0\%$ signifikant war, und zwar als „sehr wahrscheinlich nicht durch Zufall bedingtes Ergebnis".

Das Bestehen eines Zusammenhanges zwischen qualitativ verschiedenen Beobachtungsreihen prüften wir mittels der Korrelationsrechnung (2×2-Tafel, T-Verfahren nach v. Schelling, Berücksichtigung der Zahl der Freiheitsgrade und des ihr entsprechenden Zufallshöchstwerts des Korrelationskoeffizienten für eine Sicherheitsgrenze von 0,27%).

Versuchsergebnisse.

Kahmann[5] hatte die Kaninchenohren in toto gefroren und die Gerinnungszeiten des Blutes beider Ohren bestimmt; das Blut aus dem gefrorenen Ohr zeigte dabei immer eine stärkere BGZ-Verkürzung als das der Gegenseite. Er fror die Ohren 15—45 min und erzielte so auf der nichtgefrorenen Seite BGZ-Verkürzungen um 74%. Wir bemühten uns nun, eine möglichst geringe Frierdosis zu finden, die bei deutlicher BGZ-Verkürzung mit Sicherheit einen Gewebsuntergang herbeiführte. Dabei fanden wir, daß Kahmann zu robust vorgegangen war; obwohl wir nur einen kleinen Teil des Ohres froren, erzielten wir nach 10 min langem Frieren mit einer BGZ-Verkürzung um 73% (Mittelwert aus 5 Versuchen) denselben Effekt wie Kahmann. Die BGZ-Verkürzung in diesen Versuchen betrug unmittelbar nach dem Ende des 10 min langen Frierens 63%, nach 0,5 Std 73%, nach 1 Std 73%, nach 2 Std 60%, nach 4 Std 30%; der stärkste beobachtete Effekt betrug 83% (nach 1,5 Std), bei Kahmann 87%. Bei allen 5 Tieren trat Nekrose der Frierstelle mit lochförmigem Enddefekt ein. Schließlich zeigte sich, daß *nach*

1,5 min langem Frieren regelmäßig ein Lochdefekt bei ausgiebiger Verkürzung der BGZ um 63% eintrat (Abb. 1).

Sofort nach 1,5 min langem Frieren war die Frierstelle weiß-anämisch, hart und undurchsichtig, 3 min danach war das Gewebe noch kühl, die Konsistenz jedoch schon wieder normal, alle Gefäße, auch die Zentralarterie, kontrahiert. Nach weiteren 2 min waren die Gefäßspasmen vorüber, so daß die Frierstelle für kurze Zeit normales Aussehen zeigte. Dieses Stadium dauerte keine Minute an, dann setzte rasch eine Erweiterung aller Gefäße der Frierstelle ein, gleichzeitig breitete sich von den Gefäßen ausgehend eine diffuse, nicht wegdrückbare Rötung ins Friergebiet hinein aus und das Ödem begann. Insgesamt 7 min nach dem Ende des Frierens war die Frierstelle diffus gerötet, ödematös durchtränkt und

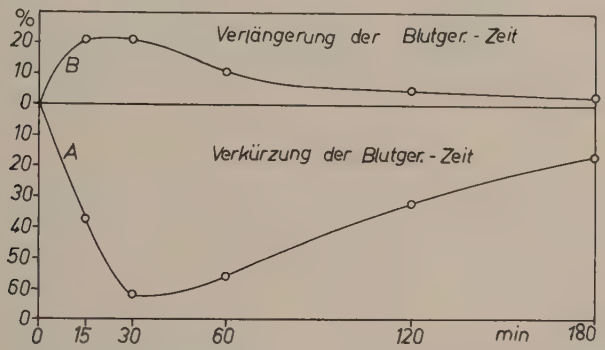


Abb. 1. Einwirkung der Antistin-Vorbehandlung (45 mg/kg 20 min vorher) auf die Verkürzung der Blutgerinnungszeit nach 1,5 min lang dauernder lokaler Erfrierung des Kaninchenohres mit CO_2-Schnee (8 cm²). Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 10 Versuchen. Abszisse: Die seit dem Ende des Frierens verstrichene Zeit in min; Ordinate: Änderung der Blutgerinnungszeit in % der Norm. Kurve A: Frieren ohne Antistin, Kurve B: Frieren nach Antistin-Vorbehandlung.

deutlich wärmer als die Umgebung, die Gefäße dieses Bezirkes waren nun auch im durchscheinenden Licht nicht mehr zu erkennen. Unsere Beobachtungen über die Reaktionen des Gefäßsystems decken sich also weitgehend mit denen von Tittel[13].

Schon bei den Vorversuchen zeigte sich, daß Antistin auch die Verkürzung der BGZ nach lokaler Erfrierung antagonistisch beeinflußt. Selbst der 10-min-Effekt wurde durch 50 mg/kg Antistin aufgehoben und durch 75 mg/kg in eine Verlängerung um 90% verwandelt; allerdings wirkten diese Antistindosen bereits toxisch, so daß die Tiere 1—2 Std nach dem Frieren starben. Nach 33—50 mg/kg Antistin traten bei 2,5 min langem Frieren Verlängerungen der BGZ um 35—40% ein, nach 5 min Frieren folgte auf die anfängliche Verlängerung der BGZ eine Verkürzung um 25—30% nach 2—3 Std.

Wir wandten schließlich bei 10 1,5 min lang gefrorenen Tieren 20 min vorher 45 mg/kg Antistin an (intramuskulär injiziert) und erhielten die Ergebnisse der Abb. 1, aus der hervorgeht, daß *die beschleunigende Wirkung der lokalen Erfrierung auf die Blutgerinnung durch die Vorbehandlung mit einem Antihistaminicum aufgehoben* wird. Die Verlängerung der BGZ bei gleichzeitiger Anwendung von Antistin kann als Eigenwirkung des Antistins angesehen werden, da wir in einer

vorangehenden Arbeit zeigen konnten (Zetler[10]), daß 32,0 mg/kg Antistin beim Kaninchen die BGZ um 16% verlängert (Mittelwert aus 10 Versuchen). — Da wir bei den Vorversuchen beobachtet hatten, daß außer den Änderungen der BGZ durch die Erfrierung auch die lokalen Erscheinungen an der Frierstelle durch Antistin günstig beeinflußt wurden, stellten wir die weiteren, im methodischen Teil geschilderten Beobachtungen bei den 20 Versuchen der Abb. 1 mit folgenden Ergebnissen an:

Das lokale Ödem an der Stelle der Erfrierung wurde durch die Antistinvorbehandlung eindeutig vermindert (Abb. 2); bei einer Verwertung der Flächenintegrale der beiden Kurven dieser Abbildungen ergibt sich eine *Verminderung des Ödems um 38%*. Über die Signifikanz der gefundenen Unterschiede unterrichtet Tab. 1. Ferner fällt auf, daß sich nach Antistin das lokale Ödem langsamer entwickelte und vor

Tabelle 1.
Signifikanz der Antistinwirkung hinsichtlich des lokalen Ödems an der Frierstelle.

	Q_{Diff} für $p = 0{,}27\%$
Normalwerte	0,73: nicht signifikant
30-min-Werte	1,39
60-min-Werte	1,59
120-min-Werte	1,53 } signifikant
180-min-Werte	1,54
24-Std-Werte	7,85

Tabelle 2. *Verminderung des kollateralen Ödems nach Antihistaminvorbehandlung.*

OHNE ANTISTIN		MIT ANTISTIN	
Tier Nr.	Schwellungsgrad	Tier Nr.	Schwellungsgrad
777	3	798	1
788	2	772	1
789	3	773	2
790	2	774	1
792	3	759	2
793	3	744	2
794	3	784a	2
795	2	790a	1
796	3	791a	2
797	3	792a	2
Mittel:	2,7		1,6
$\pm \sigma_x$:	0,48		0,516
$\pm \varepsilon_x$:	0,153		0,163

$$\sigma_{Diff} = \pm 0{,}223$$
$$t_{Diff} = 4{,}93$$
$$Q_{Diff}\,(p = 0{,}27\%) = 1{,}41$$

allem, wie der 24-Std-Wert zeigt, rascher wieder zurückbildet. Dies deutet darauf hin, daß einmal die Gefäßpermeabilität und zum anderen die restituierenden Mechanismen weniger geschädigt worden sind als beim Frieren ohne Antistinvorbehandlung.

Auch das *kollaterale Ödem*, das sich langsamer als das lokale entwickelte, wurde durch die Antistinvorbehandlung *signifikant vermindert* (Tab. 2). Dabei ist die Verringerung etwa ebensogroß wie beim lokalen Ödem, nämlich 41%. Daß die Ödembildung nach Antistin eingeschränkt war, nimmt angesichts der bekannten permeabilitätsvermindernden Wirkung der Antihistaminica (Übersicht bei HAAS[14]) nicht wunder. Es ist jedoch erstaunlich, daß auch die *Blasenbildung* an der Frierstelle als Ausdruck einer tiefergehenden Schädigung der Haut durch die Antihistaminvorbehandlung *signifikant um etwa die Hälfte vermindert* wurde (Tab. 3). Hat doch die Entstehung von Blasen zur Voraussetzung, daß die Noxe die intercellulären Bindungen zerstört. Diese Einwirkung der Antihistaminvorbehandlung auf das sich nach der Kälteeinwirkung

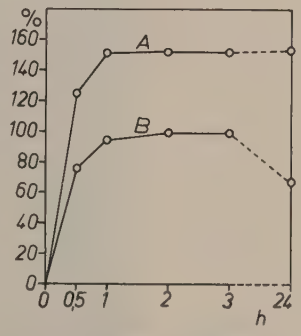


Abb. 2. Wirkung der Antistin-Vorbehandlung auf das lokale Ödem an der Frierstelle. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 10 Versuchen. Abszisse: Die seit dem Ende des Frierens verstrichene Zeit in Stunden. Ordinate: Zunahme der Dicke des Ohres in % der Norm.

Tabelle 3.

Beeinflussung der Blasenbildung an der Frierstelle durch Antihistaminvorbehandlung.

OHNE ANTISTIN		MIT ANTISTIN	
Tier Nr.	Grad	Tier Nr.	Grad
777	2	798	1
788	2	772	1
789	3	773	3
790	2	774	0
792	3	759	1
793	2	744	2
794	2	784a	1
795	2	790a	0
796	3	791a	1
797	2	792a	1
Mittel:	2,3		1,1
$\pm \sigma_x$:	0,587		0,875
$\pm \varepsilon_x$:	0,168		0,277

$$\sigma_{\text{Diff}} = \pm 0{,}333$$
$$t_{\text{Diff}} = 3{,}6$$
$$Q_{\text{Diff}}\,(p = 0{,}27\%) = 1{,}03$$

abspielende pathologisch-anatomische Geschehen zeigte sich noch eindrucksvoller bei der Betrachtung der Größe der endgültigen Gewebs-

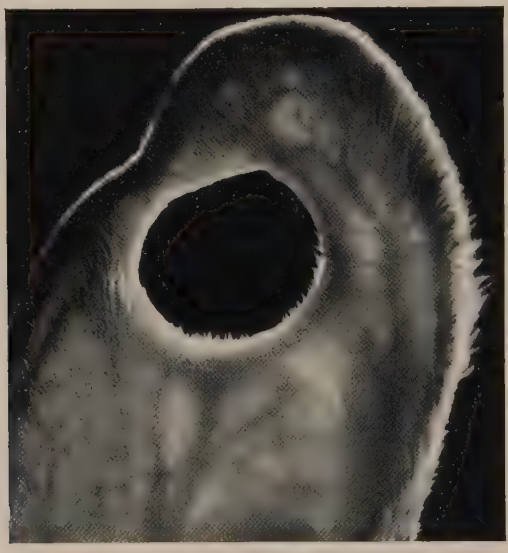


Abb. 3. Kaninchen 777: 1,5 min gefroren ohne Antistin-Vorbehandlung. Zustand 36 Tage nach dem Frieren: Typischer Lochdefekt (Größe: 5,2 cm²), Zentralarterie unterbrochen.

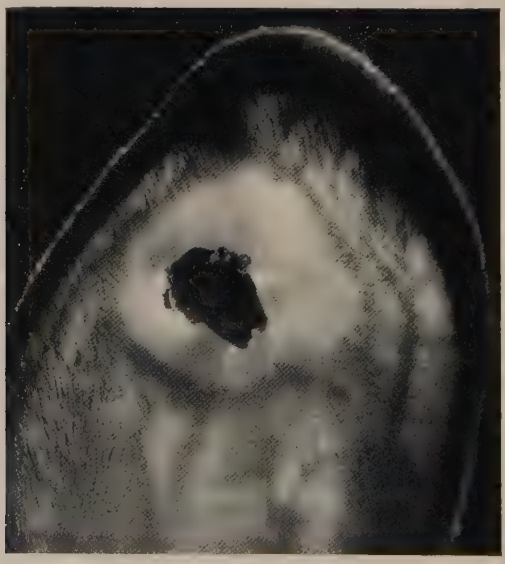


Abb. 4. Kaninchen 776: 2,5 min (!) gefroren nach Antistin-Vorbehandlung (45 mg/kg). Zustand 36 Tage nach dem Frieren: Narbenbezirk so groß wie die ursprüngliche Frierstelle, Demarkation noch im Gange. Späterer Gewebsverlust beiderseits der erhaltenen Zentralarterie: 0,8 cm².

defekte an der Frierstelle nach der Demarkation des nekrotischen Gewebes (Abb. 3 und 4). Tab. 4 zeigt, daß *nach Antistin die Gewebsdefekte signifikant um etwa 78% kleiner* waren als nach dem Frieren ohne Antistin. In einem Falle entstand überhaupt kein Loch, sondern es

Tabelle 4.

Größe der endgültigen Gewebsdefekte bzw. der Narbenbezirke, in denen diese Defekte liegen, in cm².

OHNE ANTISTIN		MIT ANTISTIN		
Tier Nr.	Defekt	Tier Nr.	Defekt	Narbe
777	5,2	798	0,7 ZAa	5,1
788	4,8	772	0,7	5,0
789	4,0	773	1,5	4,0
790	5,2	774	0,0	5,0
792	5,4	759	2,0 ZAt	5,6
793	7,0	744	1,2	4,3
794	5,0	784a	3,6	5,4
795	4,4	790a	0,5 ZA	4,8
796	5,0	791a	1,5	5,3
797	4,6	792a	0,7 ZAa	5,8
Mittel:	5,6		1,24	5,03
$\pm \sigma_x$:	0,875		1,016	0,556
$\pm \varepsilon_x$:	0,277		0,321	0,176

ZA: Zentralarterie erhalten, durchzieht den Lochdefekt.
ZAa: Zentralarterie und deren Seitenäste ziehen durch den Lochdefekt.
ZAt: Zentralarterie teilweise erhalten (zipfelförmig).

Vergleich der Größe der Gewebsdefekte nach Frieren mit und ohne Antistin:

$$\sigma_{\text{Diff}} = \pm 0{,}4232$$
$$t_{\text{Diff}} = 10{,}3$$
$$Q_{\text{Diff}}\,(p = 0{,}27\%) = 2{,}94$$

Vergleich der Größe des Gewebsdefektes nach Frieren ohne Antistin mit der Größe des Narbenbezirkes nach Frieren mit Antistin:

$$\sigma_{\text{Diff}} = \pm 0{,}3276$$
$$t_{\text{Diff}} = 1{,}74$$
$$Q_{\text{Diff}}\,(p = 0{,}27\%) = 0{,}497$$

hinterblieb eine glatte Narbe; in einem Falle war die Zentralarterie erhalten und lief als Gewebsbrücke mitten durch den Lochdefekt, in zwei Fällen waren sogar noch Seitenäste dieser Arterie erhalten. Bei den Antistintieren lagen die Defekte innerhalb eines depigmentierten Narbenbezirkes (vgl. Abb. 4), dessen Größe der des Lochdefektes nach Frieren ohne Antistin entsprach. Diese Tatsache hat den Wert einer Kontrolle, denn sie beweist, daß bei den Antistintieren wie auch bei den nicht vorbehandelten Tieren ein gleichgroßer Bezirk des Ohres gefroren worden ist. — Schließlich fanden wir noch, daß durch die Antihistamin-Vorbehandlung die Demarkation gegenüber den unvorbehandelten Kontrollen signifikant verzögert wurde (Tab. 5). Zwischen

der Verringerung der endgültigen Gewebsdefekte und der längeren Dauer des Abheilungsvorganges besteht ein statistisch gesicherter Zusammenhang (Korrelationskoeffizient r = 0,92). Es wäre deshalb zu erwägen, ob die Antistin-Vorbehandlung durch die Verminderung der entzündlichen Vorgänge (Ödem!) nicht auch die teleologisch günstige

Tabelle 5.

Einfluß der Antihistaminvorbehandlung auf die Dauer des Demarkationsprozesses.

OHNE ANTISTIN		MIT ANTISTIN	
Tier Nr.	Tage	Tier Nr.	Tage
777	14	798	57
788	21	772	27
789	23	773	19
790	18	774	26
792	21	759	45
793	24	744	49
794	37	784	38
795	24	790a	37
796	23	791a	21
797	23	792a	37
Mittel:	23,8		35,6
$\pm \sigma_x$:	5,07		12,74
$\pm \varepsilon_x$:	1,60		4,03

$$\sigma_{\text{Diff}} = \pm 4{,}336$$
$$t_{\text{Diff}} = 2{,}72$$
$$Q_{\text{Diff}}\,(p = 0{,}27\%) = 0{,}775$$
$$Q_{\text{Diff}}\,(p = 2{,}0\%) = 1{,}07$$

demarkierende Entzündung hemmt; vermindern doch die Antihistaminica im klaren Gegensatz zu Histamin die phagocytierende Tätigkeit der Leukocyten (Ludány und Vajda[26]) sowie des Retikuloendothels (Jancsò, zitiert nach Ludány und Vajda[26]; Smulders[27]); nach Matoltsy und Matoltsy[34] unterbinden Antihistaminica die Phagocytose von Tuscheteilchen durch die Capillarendothelien der Haut, ausgelöst durch Histamin, mechanische Traumen, *Erfrierung* und Verbrennung. Dann wäre allerdings angesichts der langen Zeitdauer bis zur vollendeten Demarkierung einerseits und der relativ kurzfristigen Wirksamkeit der Antihistaminkörper andererseits dem *Initialstadium* dieser reaktiven Entzündung *entscheidende Bedeutung* für den weiteren Verlauf des pathologisch-anatomischen Geschehens beizumessen. Daß nach Driessens und Vendeville sowie Pasquinelli (beide Arbeiten zitiert nach Haas[14] Antihistaminica die *Wundheilung* fördern, während Histamin sie hemmt, steht möglicherweise (siehe Wirkung dieser Stoffe auf die Phagocytose) nicht in echtem Widerspruch zu unserer Beobachtung über die

verzögernde Wirkung des Antihistaminicums auf die *demarkierende Entzündung*, die ja ein viel komplizierteres Geschehen darstellt als die regenerative Beseitigung eines Gewebsdefektes.

Im Narbenbezirk nach Erfrieren trat regelmäßig eine Depigmentierung von Haut und Haaren auf, die sich bei dunklen Kaninchen besonders schön zeigte. Diese lokale Depigmentierung bildete sich innerhalb eines Jahres nicht zurück. Bisher scheint nur Hyperpigmentierung als Erfrierungsfolge bekannt zu sein (nach Besprechung mit Herrn Prof. Dr. W. Rotter/Kiel).

Um abschätzen zu können, wieweit unsere Versuchstechnik die aus der humanen Medizin bekannten lokalen Erfrierungen nachahmt, unter-

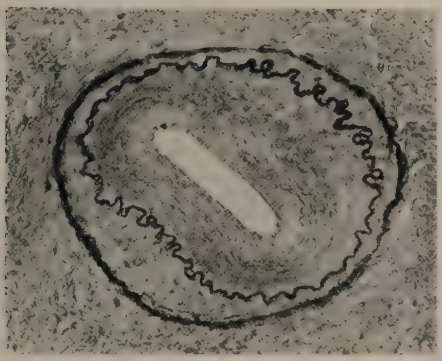


Abb. 5.

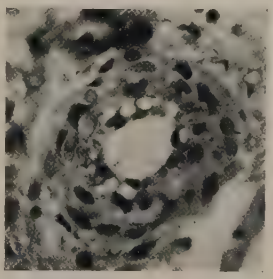


Abb. 6.

Abb. 5. Kaninchen 790a: Schwere klassische Endarteriitis obliterans der nach Frieren mit Antistin-Vorbehandlung erhalten gebliebenen Zentralarterie (Färbung: Elastica-Hämatoxylin-Eosin; Obj. 10, Ok. 10).

Abb. 6. Kaninchen 781 (0,5 min lang gefroren ohne Antistin-Vorbehandlung): Vacuolige Degeneration der Intima einer Arteriole. Beim Spiel mit der Mikrometerschraube zeigt sich besser als auf der Photographie, daß die gesamte Intima von zahlreichen Vacuolen durchsetzt ist (Färbung: Elastica-Lichtgrün; Ölimmers. 1/12, Ok. 7fach).

nahmen wir bei einer Reihe von Versuchstieren histologische Untersuchungen* der Narbenbezirke sofort nach beendeter Demarkation. Regelmäßig zeigten vorbehandelte und nicht vorbehandelte Tiere *in der Nähe der Frierstelle eine schwere klassische Endarteriitis obliterans* der Zentralarterie und ihrer Seitenäste (Abb. 5). Durch starke Wucherung des subendothelialen Gewebes der Intima waren die Lumina der Zentralarterien bis auf einen Bruchteil der Norm verengt, in den Wucherungen zeigten sich neugebildete elastische Fasern. Kleinere Seitenäste der Zentralerterien waren häufig vollkommen verschlossen, ihre Lage im Gewebsverband nur bei Elastica-Färbung leicht zu erkennen. Die Venen zeigten häufig „wabige Endophlebitis" (Staemmler[15]), die Arteriolen flügelförmige Abhebungen des Endothels (Abb. 6) entsprechend der

* Herr Prof. Dr. W. Rotter vom Pathologischen Institut der Universität Kiel sah die histologischen Schnitte durch und beriet uns bei der Bewertung der Ergebnisse. Wir danken ihm auch hier für sein liebenswürdiges Entgegenkommen.

„vakuoligen Degeneration der Intima", die Staemmler[15] an Arteriolen bei menschlichen Erfrierungen geschildert hat. Das Epithel der Haut war sehr stark verdickt mit deutlicher Parakeratose auch in den obersten Zellschichten. Besonders auffallend waren *Knorpelveränderungen, die bisher bei Mensch und Tier noch nicht beschrieben worden sind.*

In einer modernen Arbeit befaßt sich Scow[24] speziell mit der Kälteeinwirkung auf den Knorpel neugeborener Ratten; 30 Stunden nach dem Frieren des Schwanzes

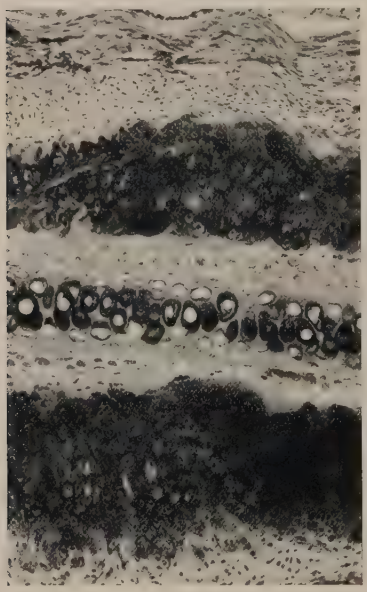


Abb. 7 a.

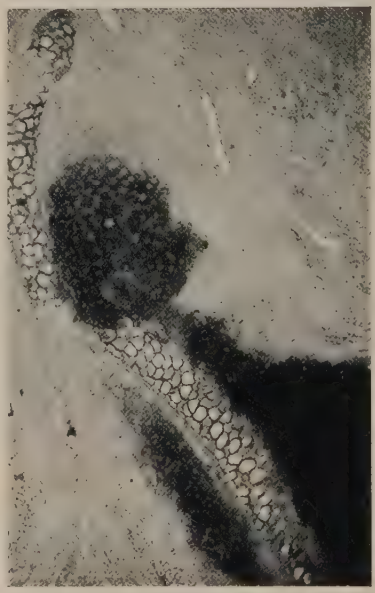


Abb. 7 b.

Abb. 7 a. Kaninchen 790 a: Perichondrale Knorpelwucherungen zu beiden Seiten der Ohr-Knorpellamelle. Das Perichondrium ist stark verbreitert (Färbung: Hämatoxylin-Eosin; Ok. 10, Obj. 10).

Abb. 7 b. Kaninchen 798: „Fraktur" der Knorpellamelle mit Dislokation der Bruchenden, callusartiges Einwuchern eines Knorpelregenerates in die Lücke, umschriebener Substanzverlust der Knorpellamelle, die stellenweise von den üppigen Knorpelregeneraten förmlich erdrückt zu werden scheint (Färbung: Hämatoxylin-Eosin; Ok. 10, Obj. 10).

zeigte das Perichondrium „erhebliche Aktivität", aber nur wenige Mitosen, 20 Tage nach dem Frieren war keine enchondrale, wohl aber excessive perichondrale Knochenbildung festzustellen. Knorpelregenerate sah Scow nicht.

Normalerweise durchzieht das Kaninchenohr im oberen Drittel eine Knorpellamelle, die etwa 3—4 Knorpelzellen dick ist (Abb. 8). Nach lokaler Erfrierung zeigte der Knorpel in den Gebieten nahe der Demarkationslinie degenerative Veränderungen, Zellkerndegeneration, Unterbrechungen der Kontinuität und Substanzverluste. Vor allem aber fielen *regelmäßig üppige Knorpelregenerate* auf, die vom *Perichondrium* ausgingen (Abb. 7 a) und oft die ursprüngliche Knorpellamelle förmlich zu erdrücken schienen. Abb. 7 b zeigt eine Knorpelfraktur mit

Dislokation der Bruchstücke und callusartig in die Frakturlücke eingewucherten Knorpelregeneraten, ferner einen umschriebenen Substanzverlust, der die Knorpellamelle wie angenagt erscheinen läßt.

Wucherungserscheinungen eines Stützgewebes nach Erfrieren waren bisher nur vom Knochen bekannt (Zöge v. Manteuffel[16], Böttcher unter Staemmler[15], Scow[24]). Scow hebt die große Kältempfindlichkeit des Knorpels hervor, die mit zunehmendem Alter seiner Versuchstiere (Ratten) allerdings abnahm. Möglicherweise ist die excessive perichondrale Verknöcherung in seinen Versuchen das Pendant zu der von uns beobachteten excessiven perichondralen Knorpelbildung (in Scows Fall Knorpel als Knochenvorstufe!).

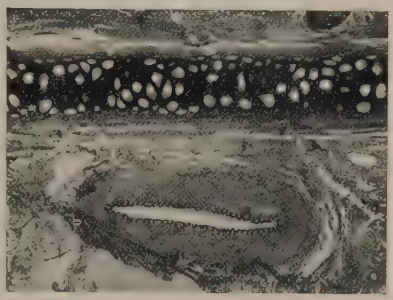


Abb. 8. Kaninchen 782 (0,5 min Frieren nach Antistin-Vorbehandlung): Dies ist das histologische Bild des normalen Kaninchenohres (Zentralarterie!). Färbung: Elastica-Lichtgrün; Ok. 6, Obj. 10).

Alle eben beschriebenen Erscheinungen zeigten sich auch bei den mit Antistin vorbehandelten Tieren, in aller Deutlichkeit auch bei Tier 774, obwohl hier der lochförmige Enddefekt durch das Antihistaminicum völlig verhindert worden war. Spezielle Beobachtungen über den Einfluß der Antihistaminbehandlung auf das histologische Bild stellten wir nicht an. Tier 782, bei dem nach Antistin und 0,5 min langem Frieren kein Loch auftrat, zeigte nach der Abstoßung oberflächlicher Borken ein ganz normales histologisches Bild des oberen Drittels des Kaninchenohres (Abb. 8).

Diskussion.

Nach unseren[10] Erfahrungen können wir sagen, daß Ausmaß und Dauer der BGZ-Änderung (Zeit bis zur maximalen BGZ-Verkürzung) nach 1,5 min langem Frieren einer intramuskulären Injektion von 0,15 mg/kg Histamin oder einer intravenösen Gabe von 0,05—0,1 mg/kg entsprechen. Ferner kann danach auch der Verlauf der Blutgerinnungskurve durchaus durch eine *einmalige Ausschüttung von Histamin aus der Frierstelle* erklärt werden, da Histamin entsprechend seiner Konzentration in der Blutbahn die BGZ verkürzt. Da man trotz gleichbleibender Größe des gefrorenen Bezirkes an Hand der BGZ-Änderungen von „*Frierdosen*" entsprechend der Frierdauer sprechen kann, müssen durch verschieden langes Frieren verschieden große Histaminmengen entstehen.

Dafür spricht auch, daß die BGZ-Verlängerung nach Antihistamin-Vorbehandlung trotz gleicher Antistin-Dosis nach 1,5-min-langem Frieren etwa 20%, nach 2,5 min Frieren 30—40% betrug; einen ähnlichen, scheinbar paradoxen BGZ-Befund erhoben und diskutierten wir bei unseren Versuchen mit parenteralen Gaben von Histamin und Antistin beim Kaninchen (Zetler[10]).

Auch Siegmund[25] betont, daß die Dauer einer Kältewirkung das Ausmaß der Schädigung bestimmt; diese Ansicht bestätigen wir im Hinblick auf die Verkürzung der BGZ nach örtlicher Erfrierung.

Kahmann[5] hatte versucht, die BGZ-Verkürzung nach lokaler Erfrierung durch *Heparin* aufzuheben und dazu außerordentlich hohe Heparindosen benötigt (30 mg/kg intravenös; in vitro 1 : 10000 bis 1 : 100000)! Die Erklärung dafür geben die Arbeiten von Gerendas[32], wonach Histamin im Blute kreisendes Heparin verdrängt. Man kann schließen, daß Antistin und Heparin auf verschiedene Weise in den Blutgerinnungsmechanismus eingreifen, da die in unseren Versuchen wirksame Antistindosis allein verabreicht die BGZ nur mäßig verlängert, während die äquivalente Heparindosis weit über diejenige hinausgeht, die normalerweise die Gerinnungsfähigkeit des Blutes völlig aufhebt; *relativ wirkt Antistin in diesem Falle gegen die Thromboseneigung des Blutes in weitaus geringerer aktueller Dosis und damit spezifischer als Heparin*! Daß die Heparin-Therapie bei lokaler Erfrierung erfolglos ist, dürfte seit der gründlichen Arbeit von Pichotka und Lewis[33] (dort weitere Literatur) erwiesen sein; diese Autoren wandten beim Kaninchen (Erfrierung einer Extremität) 6 Tage lang intravenös 20—30 mg Heparin mehrmals täglich an, wodurch die Letalität der Versuche sogar zunahm: Von 153 Heparin-Tieren starben 74, von 80 unbehandelten Kontrollen nur 17. Da nach den gleichen Autoren durch die Heparinbehandlung die Kältenekrosen nicht vermindert wurden, obwohl das Blut praktisch ungerinnbar war, kann die gesteigerte Gerinnungsfähigkeit des Blutes schon kurz nach dem Ende des Auftauens — es handelt sich um therapeutische Heparin-Anwendung! — keine wesentliche Bedeutung mehr für die weitere Entwicklung der Kälteschädigung haben; die wahre Bedeutung der verstärkten Gerinnungsneigung des Blutes für die Genese der Kältenekrose kann nur an Tieren mit prophylaktisch völlig ungerinnbar gemachtem Blute ermittelt werden.

Die Frage, was die *letzte Ursache der Histaminfreisetzung* im kältegeschädigten Gewebe sei, muß offen bleiben. Nach Siegmunds[1] Hypothese käme ein Erstickungsstoffwechsel während der Kälteeinwirkung in Frage; dem widerspricht aber, daß Lang, Schöttler, Schütte und Schwiegk[17] während und nach der Erfrierung der Hunde-Extremität keinerlei Anhaltspunkte für einen Erstickungsstoffwechsel fanden.

Die eben zitierten Autoren zeigten, daß nach Wiedererwärmung die arteriovenöse O_2-Differenz im gefrorenen und normalen Bein gegenüber der Norm vermindert war; sie führen dies auf die lange Versuchsdauer zurück. Wir glauben jedoch, darin eine Histamin-Wirkung sehen zu können, da Klein und Spiegel[18] fanden, daß intraarterielle Histamininjektion zu einer weitgehenden Herabsetzung oder fast völligen Aufhebung der O_2-Abgabe in den Capillaren des regionären Gefäßgebietes der betreffenden Arterie führt, so daß dort eine Arterialisierung des venösen Blutes auftrat.

Vielmehr dürfte die initiale Ischämie, durch die bekanntlich Histamin in Freiheit gesetzt wird (Barsoum und Smirk[19]), von Bedeutung sein; das durch sie entstehende Histamin würde dann einen etwaigen ischämischen O_2-Mangel noch verstärken. Die negative Wirkung des Histamins auf die O_2-Abgabe an die Gewebe ist wichtig, da neuerdings Pichotka, Lewis und Luft[31] zeigten, daß Hypoxie im Anschluß an lokale Kälteeinwirkung die pathologisch-anatomischen Folgen der Erfrierung deutlich vermehrt; dauerte die Hypoxie 4—5 Std, so wuchs die Menge nekrotischer Muskulatur von 33 auf 45%. In unseren Versuchen war Histamin entsprechend seiner Wirkung auf die Blutgerinnungszeit mindestens 3 Std in der Blutbahn vorhanden, nach Klein und Spiegel[18] wäre für diese Zeit mit einer verminderten O_2-Abgabe an die Gewebe zu rechnen.

Histamin stand wohl zu Recht im Mittelpunkt unserer bisherigen Gedankengänge, da alle von uns quantitativ ausgewerteten Erscheinungen durch Antistin beeinflußt wurden.

Dabei sind wir uns bewußt, daß auch die die Membran- und Capillarwand abdichtende Einwirkung der Antihistaminica (Literatur bei Haas[14]) nicht unbeachtet bleiben darf, besonders bei den von uns angewandten hohen Dosen. Es gibt jedoch Entzündungsformen (Formalin-Entzündung: Gross, zit. nach Haas[14]) und Permeabilitätsstörungen (Lungenödem nach doppelseitiger Vagotomie: Plester und Rummel[28], experimentelle Permeabilitätsstörung der Hirngefäße: Broman[29]), die durch Antihistaminica nicht beeinflußt werden, woraus die Autoren schließen, daß Histamin bei ihrer Entstehung nicht mitwirkt. Andererseits wirken Pyrazole antiphlogistisch und membrandichtend, ohne Antihistamineigenschaften zu besitzen (Wilhelmi u. Domenjoz[30]). Wir schlagen deshalb vor, auch die Wirkung von Pyrazolen auf die lokale Erfrierung zu prüfen.

Bei der relativ großen Spezifität der Antihistaminkörper dürfte jedoch der Rückschluß auf Histamin gerechtfertigt sein, besonders auch wegen der für Histamin typischen Wirkung der örtlichen Erfrierung auf die Blutgerinnung. Nun eröffnet sich ein wichtiger Ausblick auf den hypothetischen Unterschied zwischen schwacher und intensiver, sofort zerstörend wirkender Schädigung der Haut: Nach den von Haas[20] entwickelten Gedankengängen, die für chemische Hautschädigungen gelten, „spielt die Histaminausscheidung bei den in der Haut ablaufenden Prozessen überhaupt keine Rolle, wenn von vornherein eine schwere Schädigung und Verletzung der Gewebszelle erfolgt"; damit bestätige sich die von Lewis[21] sowie Feldberg und Schilf[22] bereits geäußerte Ansicht, wonach Histamin nur nach relativ schwachen Reizen ausgeschieden würde, bei einer echten Zellschädigung falle seine Funktion überhaupt aus. Die Erfrierung dritten Grades unserer Versuche ist sicher eine schwere Zellschädigung, und dennoch spricht alles für eine Histaminfreisetzung. Daß die Menge des durch den Frierprozeß entstehenden Histamins vielleicht sogar maßgebend das weitere Schicksal des gefrorenen Bezirkes beeinflußt, zeigt

die Modifizierung des Ablaufes der demarkierenden Entzündung durch das Antihistaminicum; angesichts der wahrscheinlich einmaligen Histaminausschüttung und der nur kurzfristigen Wirksamkeit des Antihistaminicums muß die biologische Situation während des Frierens und kurz danach von entscheidender Bedeutung für den weiteren langdauernden klinischen und pathologisch-anatomischen Verlauf sein. Die wichtige Frage, wie lange *nach* dem Ende des Frierens mit Antihistaminica noch therapeutische Wirkungen erzielt werden können, bedarf aus theoretischen und praktischen Gründen dringend der Klärung.

Endarteriitis obliterans nach lokaler Erfrierung wurde beim Menschen sehr häufig beobachtet, konnte im Tierversuch durch CO_2-Schnee-Vereisung oder Äther- bzw. Chloräthyl-Spray* bisher nur von Zöge v. Manteuffel[16] beim Meerschweinchen und von uns am Kaninchen erzeugt werden. Frierversuche am Rattenschwanz, die von Böttcher unter Staemmler[15] bis zur Nekrose des Schwanzes durchgeführt wurden, ergaben nie anatomische Gefäßveränderungen, obwohl die Versuche 30 bis 70 Tage dauerten; auch Ceelen[23] lehnt die Kälte als auslösende Ursache einer Endarteriitis obliterans ab. *Es erscheint uns wesentlich, darauf hinzuweisen, daß die Tiere, bei denen bisher nach Erfrierung Endarteriitis obliterans beobachtet worden ist, für Histamin weitaus empfindlicher sind als die Ratte.* Es wäre deshalb zu erwägen und experimentell zu prüfen, wieweit Histamin und Histaminempfindlichkeit für die Auslösung dieser Gefäßveränderung eine Rolle spielen können bzw. ob Antihistaminica das Bild der Endangitis obliterans nach Erfrierung quantitativ oder qualitativ ändern.

Zusammenfassung.

1. Friert man Kaninchenohren im oberen Drittel 1,5 min lang mit CO_2-Schnee in einer Fläche von 8 cm², so verkürzt sich die Blutgerinnungszeit um 63%, es tritt lokales und kollaterales Ödem sowie Blasenbildung ein, die Demarkation nekrotischen Gewebes dauert etwa 24 Tage, der endgültige Lochdefekt hat eine Größe von 5,6 cm².

2. Nach 45 mg/kg Antistin 25 min vor dem Frieren ist die Blutgerinnungszeit um 21% verlängert, lokales und kollaterales Ödem sowie Blasenbildung signifikant vermindert, der endgültige Defekt nur noch 1,24 cm² groß, die Zeit bis zum Ende der Demarkation auf etwa 36 Tage verlängert.

3. Regelmäßig wurde durch das Frieren eine schwere Endarteriitis obliterans ausgelöst, ferner zeigten sich regenerative perichondrale

* Interessanterweise nimmt nach Chloräthyl-Spray der Histamingehalt des betroffenen Hautbezirkes ab, der Bluthistamingehalt dagegen zu (Pellerat, zit. nach Haas[14]).

Knorpelwucherungen, die bisher unbekannt waren. Die pathologisch-histologischen Veränderungen wurden bei vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Tieren beobachtet.

4. Es wird der Schluß gezogen, daß Histamin oder H-Stoffe beim Zustandekommen der lokalen Kälteschädigung eine wichtige Rolle spielen.

Literatur.

[1] Siegmund, H.: Münch. med. Wschr. **89**, 827 (1942). — [2] Schade, H.: Bethes Handb. Physiol., **XVII/III**, 417. Berlin 1927. — [3] Loos, H. O.: Dermat. Wschr. **1939/II**, 1017. — [4] Ziemke, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **106**, 288 (1949). — [5] Kahmann, A.: Inaug. Diss. Kiel 1943. — [6] Barsoum, G. S., u. I. H. Gaddum: Clin. Sci. **2**, 357 (1936). — [7] Kisima, H.: Ber. Physiol. **108**, 22 (1938). — [8] Loos, H. O.: Arch. f. Dermat. **180**, 50 (1940). — [9] Ewig, W.: zit. n. K. H. Zink: „Pathologische Anatomie der Verbrennungen", Veröff. Konstit.- u. Wehrpath. **1940**, 46. — [10] Zetler, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 18 (1951). — [11] Hosemann, H.: „Die Grundlagen der statistischen Methoden für Mediziner und Biologen". Stuttgart 1949. — [12] Weber, E.: „Grundriß der biologischen Statistik". Jena 1948. — [13] Tittel, S.: Z. exper. Med. **113**, 699 (1944). — [14] Haas, H.: „Histamin und Antihistamine". Aulendorf/Württemberg 1951. — [15] Staemmler, M.: „Die Erfrierung". Leipzig 1944. — [16] Zöge v. Manteuffel: Zbl. Chir. **29**, 65 (1902). — [17] Lang, K., H. W. A. Schöttler, E. Schütte u. H. Schwiegk: Klin. Wschr. **1943**, 444 u. 653. — [18] Klein, O., u. E. Spiegel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **183**, 542 (1936). — [19] Barsoum, G. S., u. F. H. Smirk: Clin. Sci. **2**, 353 (1936). — Ber. Physiol. **99**, 82 (1937). — [20] Haas, H. T. A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 170 (1948). — [21] Lewis, Th.: "The blood vessels of the human skin and their responses". London 1927. — [22] Feldberg, W., u. E. Schilf: „Histamin". Berlin 1930. — [23] Ceelen, W.: Arch. klin. Chir. **173**, 742 (1932). — [24] Scow, R. O.: Amer. J. Path. **25**, 143 (1949). — [25] Siegmund, H.: Arch. f. Dermat. **184**, 34 (1943). — [26] Ludany, G., et J. Vajda: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 484 (1951). — [27] Smulders, I.: C. r. Soc. Biol. Paris **145**, 154 (1951). — [28] Plester, D., et W. Rummel: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 431 (1951). — [29] Broman, T.: Internat. Arch. Allergy a. appl. Immunol. **1**, 299 (1951). — [30] Wilhelmi, G., et R. Domenjoz: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 129 (1951). — [31] Pichotka, J., R. B. Lewis and U. C. Luft: Texas Rep. Biol. a. Med. **9**, 601 (1951). — [32] Csefco, J., M. Gerendas and M. D. F. Udvardy: Nature **163**, 806 (1949). — [33] Pichotka, J., and R. B. Lewis: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **72**, 130 (1949). — [34] Matoltsy, A. G., and M. Matoltsy: J. Pharmacol. exper. Ther. **102**, 237 (1951).

Nach Abschluß der Versuche und Drucklegung der Arbeit erhielten wir Kenntnis von folgenden Arbeiten:

Frommel u. Piquet [Arch. internat. Pharmacodynamie **72**, 312 (1946); **73**, 96 (1946)] froren mittels CO_2-Schnee die Hinterbeine von Meerschweinchen 10 min lang bis zu holzartiger Konsistenz; nach dieser außerordentlich eingreifenden Maßnahme sank die Serumcholinesterase ab, die Acetylcholinempfindlichkeit nahm zu, von 8 Tieren starben 4 (am 2., 3., 21. und 32. Tage danach), der lokale Heilungsprozeß dauerte 22 Tage. Wider Erwarten hatte Atropin (0,1 g/kg tägl. in den ersten 8 Tagen, dann tägl. 0,05 g/kg) keine günstige Wirkung. Nach Antergan jedoch (10 mg/kg tägl. in den ersten 11 Tagen, dann 20 mg/kg tägl.) starb kein Tier mehr, die Heilung dauerte nur etwa 17 Tage. Auch Histidinchlorhydrat zeigte

(schwächere) Heilwirkung, gleichzeitige Atropingabe verminderte den Antergan-Effekt. Verff. folgerten, daß weniger Acetylcholin als vielmehr Histamin eine Rolle zumindest bei Todesfällen nach lokaler Erfrierung spielt. — Die von uns geforderten (Naturwiss. **38**, 286 (1951)) Versuche mit *therapeutischer* Anwendung eines Antihistaminicums *nach* lokaler Erfrierung lagen also ohne unser Wissen bereits vor. Leider geben diese therapeutischen Versuche keine Antwort auf die äußerst wichtige theoretische und praktische Frage, wie spät nach beendeter Erfrierung die Antihistamintherapie einsetzen darf, um noch wirksam zu sein; in der Praxis vergehen ja meist Stunden, ehe die lokale Erfrierung in die Hand des Arztes kommt.

Th. Wense (Wien. klin. Wschr. **63**, 362 (1951)) zeigte, daß die Folgen experimenteller lokaler Verbrühung durch Antihistaminpräparate deutlich vermindert werden können; dies ist ein Hinweis ex juvantibus auf die pathophysiologischen Parallelen zwischen Erfrierung und Verbrennung, auf die wir eingangs aufmerksam machten.

Dr. med. Gerhard Zetler, Kiel, Pharmakologisches Institut, Hospitalstraße 20.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 333—340 (1952).

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität Halle/Saale
(Direktor: Prof. M. Ratschow).

Über die Wirkung „lipotroper" Stoffe auf die Regeneration der Rattenleber.

Von
Rolf Emmrich und Hans Petzold.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. Oktober 1951.)

Eine Substanz, die ein Übermaß von Fettansammlung in der Leber zu verhüten oder zu beseitigen vermag, wird als lipotroper Faktor bezeichnet[1]. Es gibt eine ganze Anzahl solcher lipotroper Substanzen, wie es auch antilipotrope Substanzen gibt, die eine Leberverfettung begünstigen. Lichtman[2] führt folgende Stoffe an:

lipotrop		*antilipotrop*	
Roh-Pankreas	Methionin	Cystin	Leberextrakt
Lecithin	Lipocain	Cystein	Thiamin
Cholin und seine	Cystin mit Cholin	Homocystein	Riboflavin
Derivate	Inositol	Eiweißmangel,	Pyridoxin
Betain	Äthanolamin	Fettreichtum	Pantothensäure
Casein		Cholesterin	Nicotinsäure
Tyrosin		Alkohol	Biotin

Das Wesen der lipotropen Wirkung wird darin gesehen, daß in der Leber lipotrope Stoffe in die Bildung der Phospholipoide eingreifen. Analysen von Fettlebern ergaben, daß bei der Leberverfettung in erster Linie Neutralfette abgelagert werden[3, 4]. Sollen diese Fette aus der Leber abtransportiert werden, so ist ihr Umbau in plasmagängige Phospholipoide notwendig.

Das Ausmaß einer Fettablagerung in der Leber hängt weitgehend ab vom Glykogengehalt der Leber, Glykogenschwund hat vielfach eine Fettinfiltration zur Folge. Lusk[5] spricht in diesem Zusammenhang von einem Antagonismus zwischen Glykogengehalt und Fettablagerung. Remy und Gerlich[6] fanden, daß bei denjenigen Methionindosen, die zusammen mit Monosacchariden die größte Glykogenanlagerung bewirken, auch die stärkste Verminderung des Fettes zu beobachten war.

Arsen-, Phosphor- und Chloroformvergiftung rufen in der Leber eine Glykogenverminderung und damit einen Einstrom von Fett in die Leber hervor. Das gleiche geschieht bei der Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff, der experimentell am meisten benutzt wird, um eine Fettleber zu erzeugen. Nach Himsworth und Glynn[7] greift der Tetrachlorkohlenstoff primär am Gefäßapparat an. Als Folge eines Gefäßspasmus kommt es zur Anoxämie und zur Fettinfiltration, wobei dann häufig auch Nekrosen auftreten.

Die genannten Gifte führen neben allgemeinen toxischen Erscheinungen sowohl zu mesenchymalen Veränderungen als auch zu einer Schädigung des Parenchyms.

In eigenen Untersuchungen sollte geklärt werden, wie wirken lipotrope Stoffe allein auf die Regeneration der Leberparenchymzellen. Im Gegensatz zur Giftwirkung werden toxische Nebenerscheinungen und eine Mitbeteiligung des Mesenchyms, bzw. der Gefäße ausgeschaltet, wenn man große Teile der Leber reseziert. Das ist bei Ratten möglich, denen die Leber bis zu $^2/_3$ entfernt werden kann, ohne daß die Tiere daran zugrunde gehen. Der restliche Leberanteil verfettet rasch, hypertrophiert und regeneriert in erstaunlich kurzer Zeit. Mit diesem Leber-Regenerationstest prüften wir zunächst zwei Stoffe, einmal das Cholin, dessen lipotrope Wirkung bekannt ist, und dann das Corhormon (Fa. „Homburg", Frankfurt/Main), dem eine regenerierende Wirkung auf den geschädigten Herzmuskel zugeschrieben wird [8, 9, 10].

Methodik.

Die Untersuchungen wurden durchgeführt an 33 Ratten mit einem Gewicht von 170—220 g. Die Tiere wurden in 3 Gruppen unterteilt: A. Leberresektionen ohne Behandlung, B. Leberresektionen und Behandlung mit Cholin, C. Leberresektionen und Behandlung mit Corhormon.

Futter: 3 Tage vor Beginn des Versuches und während des Versuches je Tier 75 g Schwarzbrot ohne Rinde und 75 g gekochte Kartoffel.

Leberresektionen: In Evipan-Narkose (10 mg Evipan-Na. auf 100 g Körpergewicht) wurden ca. $^2/_3$ der Leber reseziert. Nach 2 und nach 10 Tagen wurden die Tiere dekapitiert, in der Kontrollgruppe A einige Tiere auch nach 5 und 20 Tagen.

Dosierung: Gruppe B.: Vom 3. Tage vor Beginn des Versuches wurden täglich 0,04 g Cholin (Cholin chloratum „Merck") subcutan injiziert, täglich weiter bis zur Dekapitation.

Gruppe C.: Vom 2. Tage vor Beginn des Versuches und bis zur Dekapitation täglich 1 cm^3 Corhormon subcutan injiziert.

Untersuchungen: Untersucht wurde die jeweils bei der Resektion gewonnene gesunde Leber und dann die Leber nach Tötung der Tiere.

a) Histologische Untersuchung der Leber nach Färbung mit H.E. und mit Sudan III.

b) Chem. Untersuchungen: Gew. der Ratte, Gewicht der resezierten Leber und der regenerierten Leber; die Leber-Trockengewichte wurden bestimmt, die *Fette* und der Gesamt-N, jeweils vom resezierten Leberanteil und von der regenerierten Leber.

Ergebnisse.

a) Histologische Untersuchungen: Gruppe A (Kontrollgruppe): 2 Tage nach der Operation haben die verbliebenen Leberlappen stark an Volumen zugenommen, ihre Farbe ist deutlich gelb-braun. Histologisch ist die Bälkchenstruktur der Leberläppchen erheblich aufgelockert, stellenweise ist sie nicht mehr zu erkennen. Das Protoplasma läßt sich färberisch fast nirgends mehr nachweisen, an seiner Stelle liegt ein feines fädiges Gerüst, das größere und kleinere Hohlräume einschließt. Die Kerne zeigen im Gegensatz zur ungeschädigten Leber erhebliche Unterschiede ihrer Größe, viele Zellen enthalten 2 und auch mehr kleinere

Kerne. Die Kerne, die allein in einem Zelleib liegen, sind meist sehr groß, in vielen von ihnen haben sich die Kernkörperchen nicht deutlich dargestellt. Dagegen finden sich stark färbbare Substanzen, die verklumpten Chromosomen zu entsprechen scheinen. Mitosen waren nur vereinzelt zu sehen, nie in der ungeschädigten Leber.

Im Fettschnitt zeigt sich eine ausgeprägte diffuse groß- bis feintropfige Verfettung, die die Leberläppchen fast gleichmäßig betrifft, die Fetttropfen liegen intra- und extracellulär.

Nach 5 Tagen ist der makro- und mikroskopische Befund fast unverändert, im Bereiche der Zentralvene ist die Verfettung gering zurückgegangen. Nach 10 Tagen hat die Leber etwa ihr gleiches Volumen zurückgewonnen, die intensiv gelbliche Farbe ist wieder mehr der bräunlichen gewichen. Die Verfettung ist noch fein- bis großtropfig in- und außerhalb der Zellen, liegt aber vorwiegend in den peripheren, stellenweise auch in den mittleren Anteilen des Leberläppchens. Diesem Befund entspricht eine Regeneration des Protoplasmas. Die Zellen um die Zentralvene herum zeigen ein regelrechtes Protoplasma, während sie in der Peripherie mit ihrem „gequollenen" Leib und dem fädigen Netzwerk unverändert sind. Zellen mit 2 und mehr Kernen erscheinen vermehrt, die Kernstrukturen sind unverändert. Nach 14 Tagen weiterer Rückgang der Verfettung, die Fetttropfen liegen fast nur noch peripher. Nach 20 Tagen ist im wesentlichen wieder das Bild der normalen Leber erreicht. In der Peripherie der Läppchen ist die Verfettung noch gering vermehrt. Nur stellenweise erscheinen die Leberzellen noch protoplasmaarm. Zellen mit mehreren Kernen sind nicht auffallend vermehrt.

Gruppe B: Auch hier findet sich 2 Tage nach der Operation eine starke groß- bis feintropfige Verfettung, die sich intra- und extracellulär gelegen fast gleichmäßig über die Läppchen verteilt. Das Parenchym zeigt die gleichen Veränderungen wie bei den Tieren der Gruppe A. Allerdings erscheinen die Zellen mit 2 und mehr Kernen nicht eindeutig vermehrt. Mitosen wurden nicht beobachtet. Nach 10 Tagen ist die Fetteinlagerung weitgehend zurückgegangen, sie findet sich fast nur noch in der Peripherie als fein- bis großtropfige Ablagerung. Eine eindeutige Vermehrung der Zellen mit 2 Kernen ist auch hier nicht nachzuweisen. Es finden sich jedoch viele große Kerne mit den bereits beschriebenen Strukturveränderungen. Um die Zentralvene herum ist das Protoplasma regelrecht, während es peripher stellenweise noch durch ein fädiges Gerüst ersetzt ist.

Gruppe C: 2 Tage nach der Operation ist die Verfettung vorwiegend auf die Peripherie beschränkt, sie ist fein- bis großtropfig. An wenigen Stellen geht sie auf die mittleren Läppchenbereiche über, vereinzelt aber auch bis in die Nähe der Zentralvene. Veränderungen des Protoplasmas

finden sich nur in der äußersten Peripherie. Die Kerne zeigen verschiedene Größe, Zellen mit mehreren Kernen sind kaum vorhanden. Nach 10 Tagen besteht nur noch eine geringe fein- bis großtropfige Verfettung

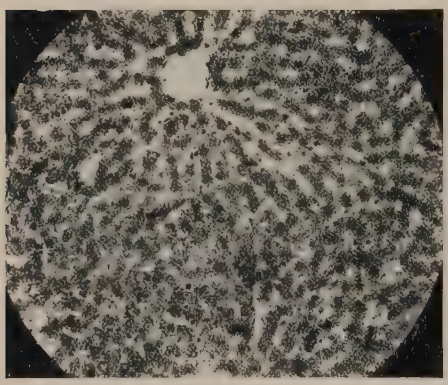


Abb. 1a.

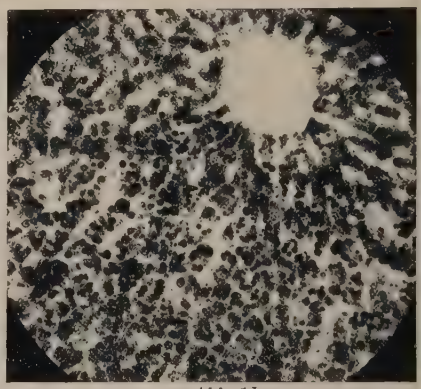


Abb. 1b.

Abb. 1. Kontrolltier (Gruppe A). a) Resezierte Leber. b) Leber 2 Tage nach der Operation (Fettfärbung). Starke fein- bis großtropfige Verfettung bis zur Zentralvene hin.

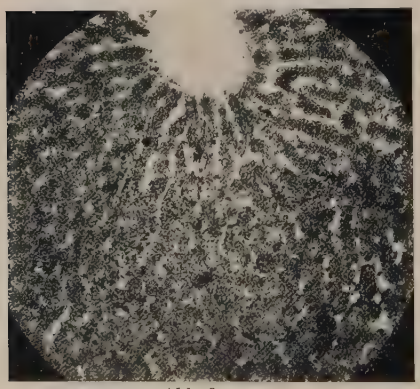


Abb. 2a.

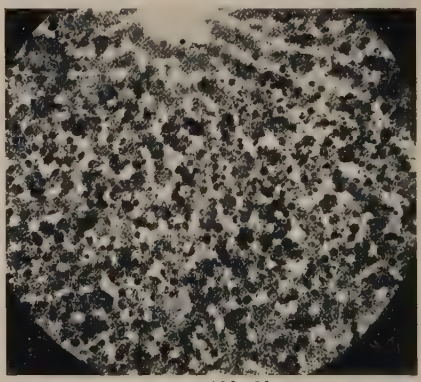


Abb. 2b.

Abb. 2. Cholin-behandeltes Tier (Gruppe B). a) Resezierte Leber. b) Leber 2 Tage nach der Operation (Fettfärbung). Starke Verfettung, weniger stark in Nähe der Zentralvene.

in der Peripherie, der Grad der Verfettung entspricht dann fast dem einer normalen Rattenleber. Veränderungen des Protoplasmas und der Kerne waren nicht festzustellen.

Zusammenfassung der histologischen Befunde: Schon die nicht geschädigte Rattenleber enthält geringe Ablagerungen von Fett. In der Regel sind es einzelne größere Tropfen, die extracellulär wahllos verstreut liegen. Nach Resektion von etwa $^2/_3$ der Leber tritt eine ausgedehnte gleichmäßige fein- bis großtropfige Verfettung des restlichen

Lebergewebes ein. Bei ihrer Ausdehnung und Resorption spielt die Höhe des Fettgehaltes der Leber vor der Operation eine gewisse, wenn auch untergeordnete Rolle. Gleichzeitig mit der Verfettung kommt es zu einem Verlust an Protoplasma, dessen Stelle von einem fädigen Gerüstwerk eingenommen wird; dieses umschließt die intracellulären Fetttropfen. Der größte Teil des Fettes liegt jedoch extracellulär.

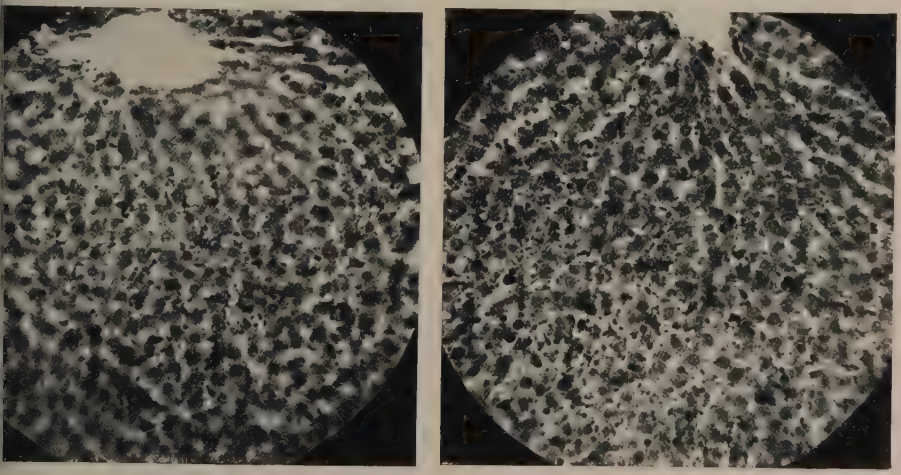


Abb. 3a. Abb. 3b.

Abb. 3. Corhormon-behandeltes Tier (Gruppe C). a) Resezierte Leber. b) Leber 2 Tage nach der Operation (Fettfärbung). Nur geringgradige Verfettung.

Die Resorption des Fettes beginnt im Bereiche der Zentralvene und schreitet nach der Peripherie fort. Nach 20 Tagen ist dieser Prozeß fast vollständig abgeschlossen.

Die Regeneration des Leberparenchyms ist bereits nach 2 Tagen an einer Vermehrung der Zellen mit 2 und mehr Kernen zu erkennen. Mitosen wurden nur vereinzelt beobachtet. Es besteht der Eindruck, daß die Zellneubildung amitotisch erfolgt. Zellen mit mehreren Kernen werden vorwiegend in den Teilen der Leber beobachtet, in denen die Neubildung des Protoplasma eingesetzt hat.

Nach Gabe von Cholin ist die Verfettung histologisch etwas geringer, die Resorption und Regeneration ist aber schneller abgeschlossen.

Unter Corhormon tritt eine Verfettung in wesentlich geringerem Umfange ein. Ein Verlust an Protoplasma wird nur an wenigen Stellen beobachtet. Nach 10 Tagen ist die Rückkehr zur Norm nahezu abgeschlossen, während dies ohne Corhormon erst nach 20 Tagen der Fall ist.

Eine eindeutige Vermehrung der Zellen mit mehreren Kernen wurde weder unter Cholin noch unter Corhormon gesehen, in keinem Stadium

der Regeneration wurde eine Vermehrung der Bindegewebszellen beobachtet.

b) Chemische Untersuchungen: In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengestellt:

Versuch	Zahl der Tiere	Lebens-Dauer Tage	Resez. Leber % vom Ges.-Gew.	Regen. Leber % vom Ges.-Gew.	Trockengew.		Fette		Ges.-N	
					Resez. Leber %	Regen. Leber %	Resez. Leber %	Regen. Leber %	Resez. Leber %	Regen. Leber %
A. Kontrolltiere	5	2	1,79	2,44	26,4	32,0	3,06	11,4	12,2	13,3
	2	5	1,95	2,78	27,4	34,8	2,1	5,87	12,2	12,0
	5	10	2,72	3,28	26,6	28,0	2,75	3,59	11,6	12,2
	2	20	1,35	3,07	27,5	29,1	3,4	3,8	12,3	11,4
B. Cholin	5	2	2,34	2,59	26,0	32,7	1,82	14,5	11,7	13,2
	4	10	2,42	3,66	25,6	26,9	2,94	2,56	12,4	11,5
C. Corhorm.	5	2	2,21	2,74	25,7	28,1	2,88	6,62	12,6	12,1
	5	10	2,06	2,66	26,4	28,1	3,08	4,32	12,3	12,5

Erläuterungen: Unmittelbar nach der Leberresektion nehmen die Tiere an Gewicht ab, in der Spalte: „regen. Leber % vom Ges.-Gew." ist auf das Gesamtgewicht nach der Dekapitation bezogen. Nach der Operation nimmt die Leber wieder rasch an Gewicht zu, hauptsächlich als Folge einer starken Fettinfiltration in die Leber. Der hohe Fettgehalt und der zugleich erhöhte Gesamt-N sprechen dafür, daß die Leber nach der Resektion an Glykogen verarmt. Nach 10 Tagen ist die Fettvermehrung kaum mehr vorhanden.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe A verhindert Cholin die Verfettung des Leberrestes nicht. Der N-Gehalt der restlichen Leber liegt höher als normal, so daß ebenso wie bei der Kontrollgruppe auch unter Cholin eine Glykogenverminderung anzunehmen ist. Nach 10 Tagen sind die Analysenwerte weitgehend normalisiert, der Fettgehalt der regenerierten Leber liegt noch unter dem Normalfettgehalt. Cholin bewirkt also im Vergleich zur Kontrolle einen besseren Abtransport der Fette aus der Leber.

Die mit Corhormon behandelten Tiere zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Cholingruppe eine auffallend geringe Fettinfiltration, aber nach 10 Tagen einen noch leicht erhöhten Fettgehalt der Leber. Der N-Gehalt ist nach 2 Tagen nicht erhöht.

Besprechung der Ergebnisse.

Nach Resektion von etwa $^2/_3$ der Rattenleber kommt es zu einer raschen Regeneration von dem erhaltenen Leberrest aus. Dabei verarmt die Restleber an Glykogen, so daß reichlich Fett eingelagert wird.

Dieses Fett wird allmählich aus der Leber wieder entfernt, ca. 10 bis 20 Tage nach der Resektion zeigt die regenerierte Leber ein völlig normales Bild.

Cholin verhindert den Fetteinstrom in die Leber nicht, es fördert aber dann den Abtransport des Fettes, so daß — wie aus den chemischen Analysen zu folgern ist — bereits nach 10 Tagen der Fettgehalt der Leber wieder ganz normal ist. Histologisch besteht der Eindruck, daß unter Cholingaben die anfängliche Verfettung etwas geringer ist als bei den Kontrollen, nach den chemischen Analysen ist sie stärker. Es läßt sich mithin die lipotrope Wirkung des Cholins auch im Regenerationstest der Leber nachweisen, wenn diese Wirkung auch verhältnismäßig gering erscheint.

Ganz auffallend ist der Corhormon-Effekt. Corhormon, ein Extrakt aus Embryo-Herzen, verhindert von vornherein eine stärkere Fettinfiltration. Es muß dies zunächst so erklärt werden, daß unter Corhormon weniger Glykogen abgebaut wird, bzw., daß unter Corhormon die Glykogensynthese gesteigert ist. Lettré[11] hat das Corhormon analysiert. Er fand einen Glührückstand von 18%, davon den weitaus größten Anteil als Magnesiumoxyd. Er vermutet eine komplexe Bindung des Mg in einer Polycarbonsäure und erörtert die Möglichkeit, daß die Mg-Ionen als Aktivatoren der Adenosintriphosphatase wirksam werden könnten. Unser Corhormoneffekt scheint die Ansicht Lettrés zu bestätigen, jedenfalls vermuten wir eine Corhormonwirkung auf Fermentsysteme der regenerierenden Leberparenchymzellen. In die Phospholipoidbildung greift das Corhormon nicht ein; nach 10 Tagen sind die Leberfette im Gegensatz zur Cholingruppe der Tiere noch nicht ganz normalisiert, obwohl histologisch die Leber wieder ganz normal erscheint. Der Corhormoneffekt, die weitgehende Verhinderung der Fettinfiltration ist im Leberregenerationstest sowohl histologisch als auch chemisch-analytisch nachzuweisen.

Zusammenfassung.

Die Resektion der Rattenleber zu etwa $^2/_3$ führt zu einer raschen Regeneration des Leberrestes, allerdings unter starker Verfettung. In diesem Regenerationstest wird die lipotrope Wirkung des Cholins bestätigt. Corhormon, ein Extrakt aus embryonalem Herzen, verhütet weitgehend die Fettinfiltration, es hat aber nicht die Eigenschaft, gespeichertes Fett in gleicher Weise zu mobilisieren wie es das Cholin vermag. Es ist demnach zu unterscheiden eine Phospholipoid-synthetisierende, bzw. lipolytische Wirkung des Cholins von einer die Verfettung verhütenden des Corhormons. Corhormon wirkt wahrscheinlich als ein Fermentaktivator, der die Leberregeneration begünstigt.

Literatur.

[1] McHenry, E. W., u. J. M. Patterson: Physiologic. Rev. **24**, 128 (1944). — [2] Lichtman, S. S.: Diseases of the liver. 2. Aufl. Philadelphia: Lea u. Febiger 1949. — [3] Schümmelfeder, N.: Verh. dtsch. path. Ges. Dortmund 1948. — [4] Hartmann, Fr., u. Fr. Leuschner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 167 (1951). — [5] Lusk, G.: Science and Nutrition. 5. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1928. — [6] Remy, R., u. N. Gerlich: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 542 (1951). — [7] Himsworth, H. P., u. L. E. Glynn: Clin. Sci. **5**, 93 (1944). — Lancet **1**, 457 (1944). — [8] v. Miko, J., u. I. Förö: Gyógyászat (ung.) **1935**, 37. — [9] Törö, I.: Magy. orv. Arch. **1936**, 4. — [10] Kuschinsky, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 424 (1949). — [11] Lettré, H.: Vortrag a. d. Chemiker-Tagung. München Sept. 1949.

Doz. Dr. Rolf Emmrich, Halle/Saale, II. Medizinische Universitäts-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 341—348 (1952).

The Chemical Division, Department of Medicine. — The University of Chicago, Chicago.

Ueber die direkte Fermentwirkung von Herzglykosiden.

Von

MELCHIOR REITER* und E. S. GUZMAN BARRON.

(Eingegangen am 26. Oktober 1951.)

Bei Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Herzglykoside ist dem möglichen Einfluß dieser Substanzen auf die Aktivität einzelner Fermentsysteme, besonders der des Kohlenhydratstoffwechsels, eine besondere Beachtung gewidmet worden (s. WOLLENBERGERS Übersichtsreferat[1]).

Nach LIBERT[2] wird die *Anaerobe Glykolyse* in Herzmuskelschnitten durch Digitoxin gehemmt. Schon vorher hatte TÖBBEN[3] über eine verminderte Glykolyse in Herz- und Skeletmuskulatur strophanthinvergifteter Tiere berichtet und in jüngerer Zeit wurde eine Glykolysehemmung durch Strophanthin in gewaschenen Pferdeerythrocyten[4] und im Meerschweinchendarm[5] beschrieben. WOLLENBERGER[1] fand jedoch die anaerobe Glykolyse von Meerschweinchenherzschnitten durch Strophanthin nicht beeinflußt.

Einige Autoren vertreten die Ansicht, daß die Herzglykoside auf diejenigen Fermentsysteme einwirken, die an der *Milchsäureoxydation* beteiligt sind. Von *in vivo*-Untersuchungen ist bekannt, daß das Herz Milchsäure leicht verwertet[6, 7], während das insuffiziente Herz diese Fähigkeit verliert und im Gegenteil Milchsäure an das Coronarvenenblut abgibt[8, 9]. Die Insuffizienz, die durch Substratverarmung im LANGENDORFF-Herz entsteht, kann nicht durch Milchsäure, aber teilweise durch Zusatz von Brenztraubensäure behoben werden[10]. SEGRE[4] berichtet über eine Steigerung der Milchsäureoxydation in Suspensionen von Pferde-Erythrocyten durch Strophanthin in einer Konzentration von 2×10^{-6} m und nimmt an, daß Strophanthin mittels seines ungesättigten Laktonringes als Wasserstoffüberträger dient. Nach GOVIER wird die Aktivität der Milchsäuredehydrase durch Digitoxin in Herzhomogenaten Vitamin E-armer Meerschweinchen stimuliert[11].

Neben einer direkten Beeinflussung der *Oxydativen Phosphorylierung*[1] ist schließlich auch die Frage einer Einwirkung auf die Aktivität der *Adenosintriphosphatase* diskutiert worden, zum Teil unter der Vorstellung, die Herzglykoside würden die Freisetzung chemisch gebundener Energie erleichtern. So berichteten HEGGLIN und Mitarb.[12] über eine gesteigerte Adenosintriphosphataseaktivität im Herzmuskelhomogenat der Ratte bei Anwesenheit von Herzglykosiden und EDMAN[13] findet eine Stimulierung der Myosin-ATPase durch Strophanthin. KIMURA und DU BOIS[14] aber behaupten, daß $4{,}7 \times 10^{-6}$ m Digitoxin und Strophanthin in höheren Konzentrationen die Hydrolyse von ATP durch eine Phosphatase

* Fellow der Rockefeller Foundation.
Gegenwärtige Adresse: München, Pharmakologisches Institut d. Universität.

des Rattenherzens, die nicht durch Ca^{++} aktiviert wird, hemmen. Korey[15] andererseits fand die Kontraktion, die in der nichtleitenden Muskelfaser nach Zusatz von ATP erfolgt, durch Digitoxin nicht abgeändert.

Angesichts dieser sich widersprechenden Berichte erachteten wir es als notwendig, die Frage einer direkten Einwirkung der Herzglykoside auf die Aktivität der Fermentsysteme, auf die eine solche beschrieben worden ist, von neuem zu bearbeiten. Das völlige Fehlen einer Einwirkung auf die untersuchten Fermentsysteme werten wir als eine Stütze für die Auffasssung, wonach die Wirkung der Herzglykoside eher über strukturgebundene Regulationsmechanismen des Zellstoffwechsels erfolgt.

Methoden.

Als Versuchstiere für die Herstellung von Herzmuskelschnitten und Herzmuskelhomogenaten dienten Ratten vom Sprague-Dawley-Stamm. Die Gewebsschnitte von 0,5—0,7 mm Dicke wurden in eiskaltem Ringer-Phosphatpuffer aufgenommen, der ständig mit O_2 durchströmt wurde. Die Ringer-PO_4-Lösung wurde zusammengestellt nach Barron und Mitarb.[16]. Die Herzmuskelhomogenate wurden nach der Methode von Potter und Elvehjem[17] in einem Raum bei 3° C hergestellt. Das Suspensionsmedium für die Homogenate entsprach mit geringen Änderungen dem von Pardee und Potter angegebenen[18]. Sauerstoffaufnahme und CO_2-Bildung wurden mit der üblichen manometrischen Methode von Warburg gemessen mit O_2 oder N_2/CO_2 als Gas. Anorganisches Phosphat wurde nach der Methode von Lowry und Lopez[19] bestimmt. Krystallisierte Phosphoglycerinaldehyddehydrase von Kaninchenmuskulatur wurde hergestellt nach der Methode von Cori und Mitarb.[20]; Milchsäuredehydrase vom Ochsenherzen nach der Methode von Straub[21]; krystallisiertes Myosin nach Szent-Györgyi[22]. Diphosphopyridinnucleotid (DPN) mit 56% Reinheit wurde von Schwarz and Company, New York bezogen. Das Bariumsalz der Adenosintriphosphorsäure (ATP) und Cytochrom C waren im Laboratorium hergestellt.

Digitoxin, das uns freundlicherweise von Dr. Cheng von Ely Lillie Company überlassen wurde, wurde in Alkohol gelöst und dann mit Wasser verdünnt; die Kontrollexperimente wurden mit der gleichen Konzentration Alkohol durchgeführt. g-Strophanthin (Ouabain), das wir freundlicherweise durch Dr. Richards von den Abbott Laboratories erhielten sowie g-Strophanthin von der Kali-Chemie A.G. waren krystallisierte Substanzen und gut wasserlöslich.

Alle Experimente wurden mehrere Male mit den gleichen Resultaten wiederholt. Die Tabellen geben nur einzelne, charakteristische Versuche wieder.

Ergebnisse.

1. Wirkung von Digitoxin auf die anaerobe Glykolyse von Herzmuskelschnitten der Ratte.

Im Warmblüterherzen ist die Milchsäurebildung unter anaeroben Bedingungen gleich der CO_2-Bildung in Ringer-Bicarbonat, p_H 7,4 mit N_2/CO_2 als Gas. In Versuchen von 3stündiger Dauer hatte Digitoxin (300 μg pro Gefäß) keinerlei Effekt auf die Geschwindigkeit der CO_2-Bildung (Tab. 1).

Tabelle 1. *Wirkung von Digitoxin auf die anaerobe Glykolyse von Herzmuskel-(Ventrikel-)schnitten der Ratte.*

RINGER-Bicarbonat-Puffer p_H 7,4; Gas N_2/CO_2; Glucose 0,01 m; Digitoxin 300 μg; Gesamtvolumen 3,0 cm³. Die angegebenen Werte beziehen sich auf mm³ CO_2 pro mg Trockengewicht. Temperatur: 37,5° C.

Zeit in Minuten	CO_2-Bildung in mm³	
	Kontrolle	Digitoxin
5	1,36	1,55
10	2,19	2,25
20	3,10	3,20
30	3,58	3,75
60	4,45	4,60
90	5,22	5,20
120	5,66	5,66
150	6,38	6,22
180	6,71	6,55

An der anaeroben Glykolyse sind zwei Oxydations-Reduktions-Fermente beteiligt: Phosphoglycerinaldehyddehydrase, welche Phosphoglycerinaldehyd zu Phosphoglycerinsäure oxydiert bei gleichzeitiger Reduktion von Diphosphopyridin-nucleotid (DPN), sowie Milchsäuredehydrase, welche Brenztraubensäure zu Milchsäure reduziert bei gleichzeitiger Oxydation des reduzierten DPN.

g-Strophanthin hatte keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Phosphoglycerinaldehyd-Oxydation durch Phosphoglycerinaldehyddehydrase (Tab. 2). In diesen Versuchen erfolgte der Zusatz des Strophanthins zum Ferment 10 min vor den anderen Bestandteilen des Reaktionssystems. Die Geschwindigkeit der Reaktion wurde gemessen nach der Zugabe von DPN zur Zeit Null.

Tabelle 2. *Wirkung von g-Strophanthin auf die Geschwindigkeit der Oxydation von Phosphoglycerinaldehyd durch Phosphoglycerinaldehyddehydrase.*

Pyrophosphat-Puffer p_H 8,2, 3×10^{-5} m pro cm³; Arsenat 6×10^{-6} m; Cystein 4×10^{-6} m; Diphosphopyridin-nucleotid 1×10^{-7} m; Phosphoglycerinaldehyd $2{,}5 \times 10^{-7}$ m; g-Strophanthin 1×10^{-6} m; Fermenteiweiß (Dehydrase) 4 μg. Gesamtvolumen 4 cm³. Temperatur 25° C. Schichtdicke 1 cm.

Zeit in Minuten	Extinktion bei 340 mμ	
	Kontrolle	g-Strophanthin
1	0,137	0,139
2	—	0,237
3	0,278	0,280
4	0,325	0,330
5	0,354	0,360

2. Wirkung von Strophanthin auf die O_2-Aufnahme von Herzmuskelschnitten der Ratte in Gegenwart von Milchsäure sowie auf die Oxydation von Milchsäure durch Milchsäuredehydrase.

Es ist bekannt, daß Milchsäure durch Herzmuskelschnitte oxydiert wird. In Versuchen von 2stündiger Dauer hatte g-Strophanthin in Konzentrationen von $1{,}3 \times 10^{-5}$ m und 4×10^{-5} m keinerlei Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch (Tab. 3). Die geringe Abnahme von 6% kann nicht als

Tabelle 3. *Wirkung von g-Strophanthin auf die Sauerstoffaufnahme von Ventrikelschnitten der Ratte in Gegenwart von Lactat.*

Ringer-Phosphat-Puffer, p_H 7,4; Lactat 0,01 m; Temperatur 37,5° C. Die Werte beziehen sich auf mm^3 O_2 pro mg Trockengewicht.

Zeit in Minuten	O_2-Verbrauch		
	Kontrolle	$1{,}3 \times 10^{-5}$ m;	4×10^{-5} m g-Strophanthin
10	2,4	2,6	2,4
20	4,9	4,9	4,9
30	7,1	6,9	7,1
60	13,5	13,0	13,1
90	19,8	18,6	18,6
120	26,0	24,5	24,5

signifikant betrachtet werden. Das gleiche Ausbleiben einer Glykosidwirkung wurde bei der Messung der Milchsäureoxydation durch Milchsäuredehydrase festgestellt. Das Strophanthin wurde der isolierten Milchsäuredehydrase vor den anderen Reaktionspartnern zugesetzt und die Oxydation der Milchsäure zu Brenztraubensäure über die Reduktion von DPN spektrophotometrisch verfolgt (Tab. 4).

Tabelle 4. *Einfluß von g-Strophanthin auf die Geschwindigkeit der Milchsäureoxydation durch Milchsäuredehydrase.*

Phosphat-Puffer 0,074 m, p_H 7,2, 2,7 cm^3; Na-Lactat 1 m, 0,3 cm^3; HCN 1 m, 0,2 cm^3; DPN 0,4 mg in 0,2 cm^3; Wasser oder g-Strophanthin 0,01 m, 0,3 cm^3; Eiweiß 100 μg in 0,05 cm^3; Schichtdicke n = 1 cm.

Zeit in Minuten	Extinktion bei 340 mμ	
	Kontrolle	g-Strophanthin
1	0,293	0,288
2	0,391	0,386
3	0,469	0,462
4	0,539	0,520
5	—	0,570
6	—	0,610
7	—	0,645

3. Einfluß von Strophanthin auf die Oxydation von Essigsäure und Oxalessigsäure durch Rattenherzhomogenat.

In Saccharoselösung homogenisiertes Herzmuskelgewebe kann Essigsäure und Oxalessigsäure rasch oxydieren. Durch Zugabe von Strophanthin wurde die Geschwindigkeit dieser Reaktion nicht beeinflußt (Tab. 5).

Tabelle 5. *Wirkung von g-Strophanthin auf die Oxydation von Essigsäure und Oxalessigsäure durch Rattenherz-Homogenat.*

10%iges Homogenat in 8,5% Saccharose 0,2 cm³; K-Phosphat p_H 6,95 , 0,02 m; $MgCl_2$ 0,0033 m; Cytochrom-C 0,000027 m; ATP 0,0016 m; Saccharose 0,06 m; Mg-Acetat 0,01 m; K-Oxalacetat 0,01 m; Temperatur 37,5° C.

Zeit in Minuten	O_2-Aufnahme in mm³	
	Kontrolle	g-Strophanthin
10	32,4	36,1
20	65,0	70,8
30	94,3	100,8
60	149,3	156,0
80	173,0	177,0

4. Wirkung von Strophanthin auf die aerobe Phosphorylierung von Rattenherz-Homogenat.

Die an der Phosphorylierung beteiligten Fermente sind, wenn sie in rohen Gewebshomogenaten vorliegen, gegenüber der Einwirkung höherer Temperaturen äußerst empfindlich. Ihre Aktivität nimmt bei 37° C rasch ab. Aus diesem Grunde wurde die O_2-Aufnahme und die Phosphorylierung des Herzhomogenates nach einem Temperaturausgleich von nur 5 min und einer Sauerstoffsättigung der Reaktionsgefäße von 2 min gemessen. Vor Sauerstoffsättigung und Temperaturausgleich wurde den Homogenaten Strophanthin zugesetzt, so daß es mit den Homogenaten etwa 10 min vor Beginn der manometrischen Ablesung in Berührung war. Weder O_2-Aufnahme noch die Aufnahme von anorganischem Phosphat wurde durch Strophanthin beeinflußt (Tab. 6).

Tabelle 6. *Wirkung von g-Strophanthin auf die aerobe Phosphorylierung von Rattenherz-Homogenat.*

Phosphat-Puffer p_H 6,95, 0,015 m; $MgCl_2$ 0,005 m; ATP 0,001 m; NaF 0,025 m; K-Pyruvat 0,036 m; K-Succinat 0,001 m; Saccharose 0,06 m; Cytochrom C $2{,}7 \times 10^{-5}$ m; g-Strophanthin I = 10^{-4} m; II = 10^{-5} m; III = 10^{-6} m; 10%iges Homogenat 0,4 cm³; Gesamtvolumen 3,0 cm³. Temperatur 37,5° C; Zeit 15 min.

Messungen	Kontrolle	g-Strophanthin
	Mikroatome	Mikroatome
I. O_2-Aufnahme	7,7	7,3
P-Aufnahme	14,6	14,4
II. O_2-Aufnahme	7,2	7,5
P-Aufnahme	13,2	14,5
III. O_2-Aufnahme	5,3	5,1
P-Aufnahme	8,9	8,9

5. Wirkung von Strophanthin auf die Aktivität von Adenosintriphosphatase (krystallisiertes Myosin).

Die Fermentaktivität wurde in diesen Versuchen gemessen durch die manometrische Bestimmung der bei der Hydrolyse des ATP zu ADP + H_3PO_4 in Bicarbonatpuffer erfolgenden CO_2-Bildung. Die Myosinlösung aus dem Seitenarm des Atmungstroges wurde mit dem ATP-haltigen Bicarbonatpuffer des Hauptraumes zur Zeit Null gemischt. g-Strophanthin in den Konzentrationen 5×10^{-5} m und 5×10^{-4} m hatte keinen Einfluß auf die Fermentaktivität des Myosins (Tab. 7).

Tabelle 7. *Wirkung von g-Strophanthin auf die Aktivität von Myosin-Adenosintriphosphatase.*

Puffer: KCl, $NaHCO_3/CO_2$, gesättigt mit N_2/CO_2 (95/5), p_H 7,8; $CaCl_2$ 0,005 m; ATP 5 mg; Myosin 50 μg. Temperatur 28° C. Die Fermentaktivität wurde gemessen durch die Bestimmung des bei der Neutralisation von H_3PO_4 freiwerdenden CO_2.

Zeit in Minuten	CO_2-Bildung in mm³	
	Kontrolle	g-Strophanthin 5×10^{-4} m; 5×10^{-5} m
3	48,0	52,4 54,0
6	74,0	77,0 80,0
10	98,2	100,0 102,3
15	120,3	123,5 120,7
20	138,1	139,0 141,5
30	157,6	158,3 162,5
40	172,6	172,5 177,8
50	177,3	178,0 184,9

Diskussion.

Die hier mitgeteilten Versuche zeigen, daß Digitoxin in den von Libert[2] angewendeten Konzentrationen die anaerobe Glykolyse von Herzmuskelschnitten in keiner Weise beeinflußt. Weiterhin hat das Herzglykosid g-Strophanthin keinen Einfluß auf die Aktivität der beiden an der Milchsäurebildung beteiligten Oxydoreduktionsfermente: Phosphoglycerinaldehyddehydrase und Milchsäuredehydrase. Da die Phosphoglycerinaldehyddehydrase ein -SH-Ferment ist, dessen Sulfhydrylgruppen frei reaktionsfähig sind[23], ist das Fehlen einer Strophanthinwirkung ein Beweis dafür, daß Herzglykoside nicht mit -SH-Gruppen von Fermenten reagieren.

Der oxydative Weg des Kohlenhydratabbaues, gemessen an der Oxydation von Essigsäure und Oxalessigsäure, wird ebenfalls durch Strophanthin nicht beeinflußt, was mit den Ergebnissen der Experimente von Wollenberger[24] an Gewebshomogenaten übereinstimmt. Das gleiche Fehlen einer Glykosidwirkung wurde beobachtet bei der mit der Kohlenhydratoxydation gekoppelten Phosphorylierung sowie bei der Hydrolyse von ATP.

Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß die Herzglykoside keine direkte Wirkung auf die Fermente ausüben, die maßgebend sind für die Verwertung der Kohlenhydrate, dem wesentlichen Betriebsstoff für die Arbeit des Herzens. Ihr Angriffspunkt muß an anderer Stelle gesucht werden. Die Herzglykoside können in dieser Beziehung vielleicht verglichen werden mit den Hormonen, die eine bestimmte Wirkung auf den Gewebsstoffwechsel ausüben ohne dabei Glieder von Fermentsystemen zu sein.

Kann eine Wirkung der Herzglykoside auf isolierte Fermentsysteme und auf Herzmuskelhomogenat nicht festgestellt werden, so findet man doch im Herz-Lungen-Präparat bei konstant gehaltenem äußerem diastolischem Volumen (Peters und Visscher[25]), daß die Verbesserung der Arbeitsleistung des spontan insuffizienten Herzens durch Digitalis mit einer Zunahme des Sauerstoffverbrauches verbunden ist. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Stimulierung des aeroben Stoffwechsels wurden am isolierten Katzenherzen[26] sowie an Froschherzen[27, 28] erhalten. Auch die Normalisierung der Milchsäureverwertung unter der Glykosidwirkung ist Ausdruck des verbesserten aeroben Stoffwechsels. Da diese Stoffwechselwirkung der Herzglykoside nur am ganzen Herzen und nicht im Homogenat oder in isolierten Fermentsystemen beobachtet werden kann, hat man Grund zu der Annahme, daß die Intaktheit der Zellstruktur eine Voraussetzung für ihr Zustandekommen ist.

In der lebenden Zelle wird die Geschwindigkeit der Fermentreaktionen durch eine Anzahl von Regulationsmechanismen intra- und extrazellulärer Art gesteuert[29], wobei der Zellmembran eine besondere Rolle für die Regulation des Zellstoffwechsels zukommt. Es ist möglich, daß die mit der Zellmembran verbundenen Regulationsmechanismen während der Herzinsuffizienz verändert sind. Die Rolle der Herzglykoside wäre dann direkt verbunden mit ihrer Einwirkung auf die strukturgebundenen Regulationsmechanismen des Zellstoffwechsels.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung von Herzglykosiden auf die anaerobe Glykolyse von Herzmuskelschnitten studiert, auf die Milchsäure- und Essigsäureoxydation in Herzmuskelschnitten bzw. Herzmuskelhomogenaten, auf die oxydative Phosphorylierung in diesen Homogenaten, auf die Oxydation von Phosphoglycerinaldehyd und von Milchsäure durch gereinigte Fermentsysteme sowie auf die Hydrolyse von ATP durch Myosin-ATPase. Sie hatten *keinen* Einfluß auf die Aktivität dieser Fermentsysteme. Angesichts dieser Befunde wird der mögliche Wirkungsmechanismus der Herzglykoside diskutiert.

Literatur.

[1] Wollenberger, A.: J. of Pharmacol. **2**, 97, 311 (1949). — [2] Libert, O.: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **28**, 778 (1946). — [3] Többen, H.: Inaugural Diss., Münster 1933, zit. bei Wollenberger[1]. — [4] Segre, G.: Arch. internat. Pharmacodynamie **75**, 227 (1948). — [5] Werner, G.: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 323 (1949). — [6] Himwich, H. E., Y. D. Koskoff u. L. H. Nahum: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **25**, 347 (1928). — [7] McGinty, D. A.: Amer. J. Physiol. **98**, 244 (1931). — [8] Gottdenker, F., u. C. J. Rothberger: Arch. f. Physiol. **237**, 59 (1937). — [9] Gollwitzer-Meier, K.: Arch. f. Physiol. **245**, 385 (1941). — [10] Nakamura, K., P. R. Saunders, J. L. Webb, H. C. Lawson u. C. H. Thienes: Amer. J. Physiol. **158**, 269 (1949). — [11] Govier, W. M., N. Yanz u. M. E. Grelis: J. of Pharmacol. **88**, 373 (1946). — [12] Hegglin, R., H. Grauer u. R. Münchinger: Experientia **5**, 127 (1949). — [13] Edman, K. A. P.: Experientia **7**, 70 (1951). — [14] Kimura, T. E., u. K. P. DuBois: Science (Lancaster, Pa.) **106**, 370 (1947). — [15] Korey, S.: Biochim. et Biophys. Acta **4**, 58 (1950). — [16] Barron, E. S. G., J. Meyer u. Z. B. Miller: J. Investigative Dermatology **11**, 97 (1948). — [17] Potter, V. R., u. C. A. Elvehjem: J. of biol. Chem. **114**, 495 (1936). — [18] Pardee, A. B., u. V. R. Potter: J. of biol. Chem. **181**, 739 (1949). — [19] Lowry, O. H., u. J. A. Lopez: J. of biol. Chem. **162**, 421 (1946). — [20] Cori, G., M. Slein u. C. Cori: J. of biol. Chem. **173**, 605 (1948). — [21] Straub, F.: Biochemic. J. **34**, 483 (1940). — [22] Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction, 2nd ed. N. Y. 1951, Seite 146. — [23] Barron, E. S. G.: Advances in Enzymology **11**, 201 (1951). — [24] Wollenberger, A.: J. of Pharmacol. **91**, 39 (1947). — [25] Peters, H., u. M. B. Visscher: Amer. Heart J. **11**, 273 (1936). — [26] Rohde, E., u. S. Ogawa: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **69**, 200 (1912). — [27] Eismayer, G., u. H. Quincke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **150**, 308 (1930). — [28] David, J. C.: J. of Pharmacol. **40**, 229 (1930). — [29] Barron, E. S. G., J. A. Muntz u. B. Gasvoda: J. gen. Physiol. **32**, 163 (1948).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 349—357 (1952).

Aus dem Institut für experimentelle Pathologie und Balneologie der Univ. Hamburg.

Zur Herzwirkung einiger Sympathicomimetica mit peripher gefäßerweiternder Wirkung.

Von

Kl. Gollwitzer-Meier und H. Jungmann.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Juli 1951.)

In der Therapie der peripheren Kreislaufstörungen spielen neuerdings Körper eine große Rolle, die sich in ihrer chemischen Konstitution vom Adrenalin oder von adrenalinhaltigen Wirkstoffen ableiten, und je nach der Abwandlung der Seitenkette im Molekül die constrictorischen Eigenschaften des Adrenalins in dilatatorische Wirkungen gekehrt zeigen.

Zu diesen Stoffen gehören das von Külz und Schneider[1] entwickelte Phenyl-Iso-Butyl-nor-Suprifen* und das Phenyl-Butyl-nor-Adrenalin, (im folgenden einfach Phenyl-Butyl-Suprifen und Phenyl-Butyl-Adrenalin genannt). Während die Wirkung dieser Stoffe auf den peripheren Kreislauf wiederholt beschrieben[2, 3, 4] ist, scheint ihre Wirkung auf die Dynamik und Energetik des Herzens wenig untersucht.

Wir haben Untersuchungen mit den genannten Stoffen am entnervten Herz-Lungen-Präparat von Hunden angestellt. Wir stellen ihre Wirkung der Wirkung des Adrenalins am selben Präparat gegenüber, die sich aus unseren früheren[5] und neueren Untersuchungen ergaben.

Methodik. Die Versuche wurden am Starlingschen Herz-Lungen-Präparat von Hunden durchgeführt, die mit Morphin und Chloralose narkotisiert waren.

Der Druck vor dem re. Herzen bzw. der Druck im re. Vorhof wurde in allen Versuchen gemessen. Die Registrierung erfolgte meistens optisch mit einer Frankschen Kapsel, in einem Teil der Versuche unter Benutzung einer Mareyschen Kapsel. In zahlreichen Versuchen wurde auch das Herzvolumen bestimmt. Zur Messung des Aortendrucks verwandten wir das elektrische Transmissionsmanometer von Hampel und Rein[6].

Den Sauerstoffverbrauch des Herzens bestimmten wir mit der „internen Methode" (Evans und Starling[7]) aus der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz und der Coronardurchblutung. Die arterielle und venöse Sauerstoffsättigung im Coronarblut ermittelten wir photoelektrisch nach Kramer[8].

Die Coronardurchblutung wurde am Coronarsinus gemessen, und zwar sowohl mit der Weeseschen Wippe, als mit der Reinschen Stromuhr.

Die verschiedenen Pharmaca wurden i.v. in die V. cava superior injiziert. Die gewöhnliche Dosierung betrug für Phenyl-Butyl-Suprifen 0,015—0,5 mg, für Phenyl-Butyl-Adrenalin 0,05—0,1 mg.

* = Dilatol.

Wir unterscheiden zwischen der Wirkung der ersten und der folgenden Injektionen der Stoffe.

Versuchsergebnisse.

1. Herzdynamik. Die fördernde Wirkung auf die Contractilität des Herzmuskels, die dem Adrenalin zukommt, ist auch eine Eigenschaft der zwei untersuchten Stoffe.

Das diastolische Herzvolumen sinkt unter 0,25 mg Phenyl-Butyl-Suprifen deutlich ab und mit ihm der Druck im rechten Vorhof (Abb. 1). Diese herzdynamische Wirkung beschränkt sich auf die erste Gabe des Stoffs: Die nächsten unmittelbar anschließend verwendeten Dosen von 0,5 mg Phenyl-Butyl-Suprifen bleiben ohne jede Wirkung auf das diastolische Herzvolumen und auf den Druck im rechten Vorhof.

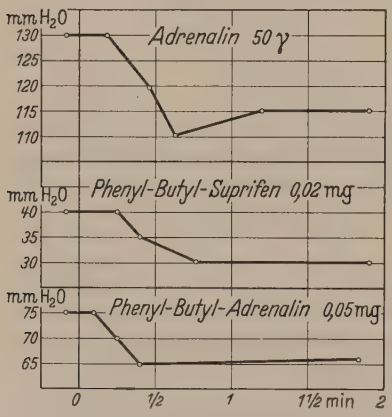


Abb. 1. Verhalten des Drucks im re. Vorhof nach Adrenalin, Phenyl-Butyl-Suprifen und Phenyl-Butyl-Adrenalin an Herz-Lungen-Präparaten von Hunden, jeweils nach der 1. Injektion.

Den Verlauf des Druckes im rechten Vorhof unter Adrenalin, Phenyl-Butyl-Suprifen und Phenyl-Butyl-Adrenalin, bei deren erster Einspritzung an drei verschiedenen Herz-Lungen-Präparaten, zeigt die Abb. 1. Die Ausgangswerte sind manchmal normal, manchmal abnorm hoch; sie liegen zwischen 40 und 130 mm H_2O. Unter dem Einfluß der untersuchten zwei Substituten sank der Druck im rechten Vorhof um 13—27% ab wie bei Adrenalin, doch hatten die Änderungen des Füllungsvolumens und des Füllungsdrucks etwas längere Dauer (bis 10 min und mehr).

2. Herzfrequenz. Der Einfluß der zwei untersuchten Stoffe auf die Herzfrequenz ist fördernd sympathicomimetisch (Abb. 2), aber an jedem individuellen Herzen verschieden, was den Eintritt, den Anstieg, die Spitze und die Dauer dieser fördernden Wirkung betrifft.

Die geringere Herzbeschleunigung bewirkt mit einer einzigen Ausnahme das Phenyl-Butyl-Suprifen.

In 7 von 8 Versuchen stieg die Frequenz entweder fast gar nicht oder nur um 12% an und nur in einem einzigen Versuch um 40%. Nach Phenyl-Butyl-Adrenalin stieg die Frequenz um Werte zwischen 14 und 100%.

Abb. 2. Verhalten von Sauerstoffverbrauch, Wirkungsgrad der mechanischen Arbeit, Coronarvolumen und Herzfrequenz nach Phenyl-Butyl-Suprifen (A) und Phenyl-Butyl-Adrenalin (B) an jeweils verschiedenen Herz-Lungen-Präparaten. (Die Zahlen zu Beginn der Kurven geben die Versuchsnummer an.) (Abb. nebenstehend.)

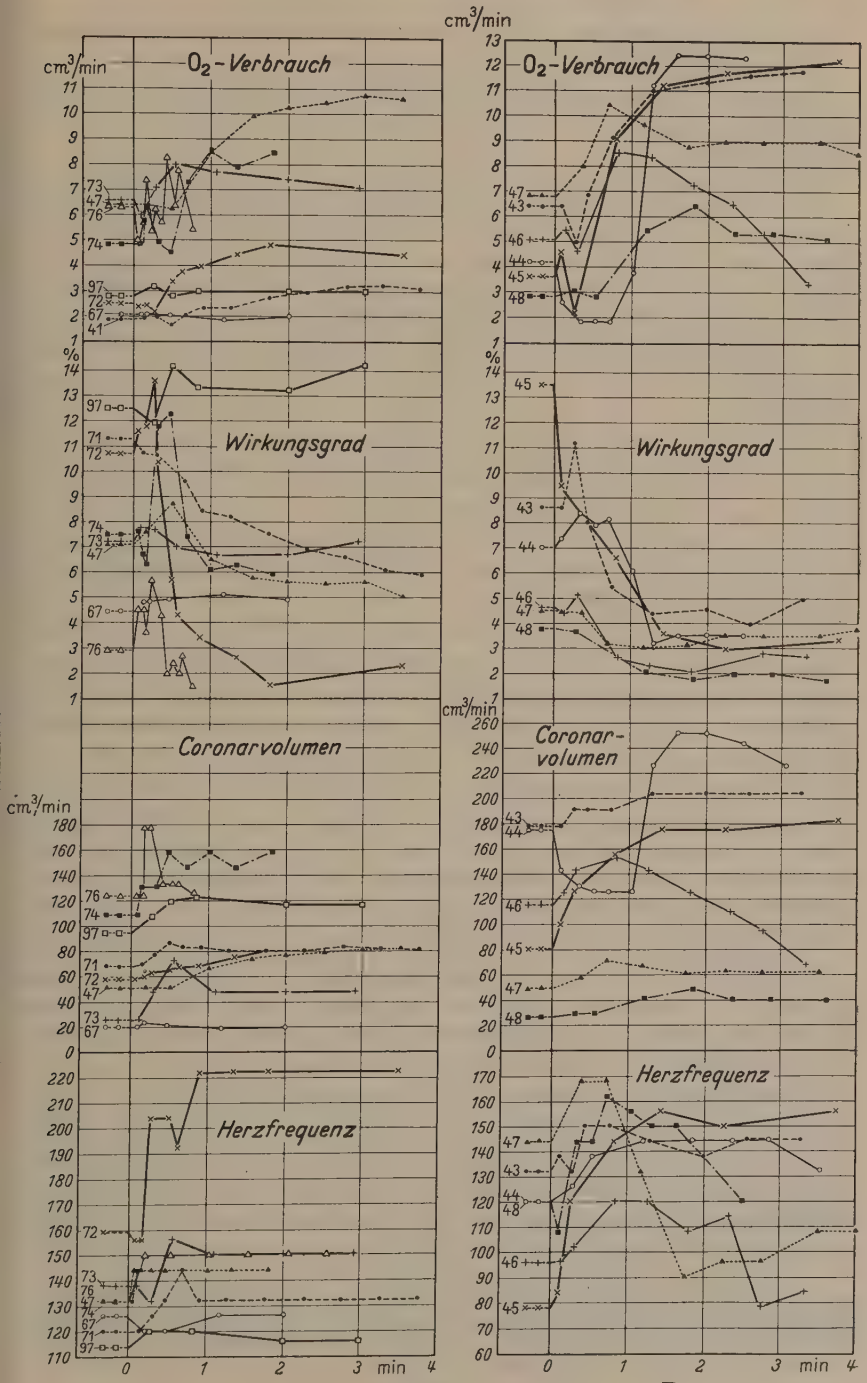

cm³/min
O₂-Verbrauch
%
Wirkungsgrad
cm³/min
Coronarvolumen
cm³/min
Herzfrequenz
min
A
B

Abb. 2.

Eine initiale Bradykardie fand sich 3mal beim Phenyl-Butyl-Suprifen, 1mal beim Phenyl-Butyl-Adrenalin.

Auffallend frühe, therapeutisch ungünstige Rhythmusstörungen (gehäufte Blockierungen und Extrasystolen) sind eine Eigenart des Phenyl-Butyl-Adrenalins.

3. Die mechanische Arbeit. Die mechanische Herzarbeit, die unter Adrenalin am Herz-Lungen-Präparat eine kurzdauernde Steigerung aufweist, ändert sich unter den zwei anderen Pharmacis weit weniger einheitlich. Unter Phenyl-Butyl-Suprifen zeigte sie 4mal einen anhaltenden, 1mal einen flüchtigen, initialen Anstieg, 3mal fiel sie etwas ab. Unter Phenyl-Butyl-Adrenalin war die Herzarbeit nur 2mal und wenig nachhaltig vergrößert, 1mal unverändert, 2mal anhaltend verkleinert (bis 25%).

Der Einfluß auf die Herzarbeit kommt dadurch zustande, daß das Herzminutenvolumen infolge der verbesserten Contractilität des Herzens unter Verminderung des systolischen Restbluts zunimmt. Der Anstieg des Aortendrucks ist allein auf die Vergrößerung des Minutenvolumens zu beziehen und in seiner Stärke und Dauer von dem vergrößerten Herzauswurf abhängig.

4. Die Herzgefäßwirkung. Die coronare Durchflußgröße, gemessen am venösen Ausfluß aus dem Coronarsinus, die am Herz-Lungen-Präparat während der Suffizienz der Herzarbeit unter den nahezu konstanten druckpassiven Einflüssen steht, läßt bei den zwei untersuchten Pharmacis eine sympathocomimetische Erweiterungswirkung auf die Kranzgefäße erkennen (Abb. 2).

Phenyl-Butyl-Suprifen bewirkte in 6 von 8 wiedergegebenen Versuchen eine Zunahme des coronaren Blutvolumens um 29—77%. Einmal fehlte eine Änderung, einmal kam eine Erweiterungswirkung sehr spät in Gang. Die Zunahme der Durchblutung war stetig und anhaltend, in einigen Versuchen über 6 min lang zu beobachten.

Phenyl-Butyl-Adrenalin besitzt eine ebenso konstante coronare Wirkung. Wir fanden in 4 von 6 berichteten Versuchen eine stetige und anhaltende Zunahme des coronaren Stromvolumens die 14—125% betrug. 2mal war die coronare Wirkung ambivalent, 1mal änderte sie sich zuerst um —29%, dann um +42%; das andere Mal um +31%, dann um —46%.

Der oxydative Herzstoffwechsel ist unter den zwei geprüften Pharmacis erheblichen, individuell verschiedenen Veränderungen unterworfen, die aus dem Verhalten der einzelnen Herz-Lungen-Präparate vor der Prüfung nicht vorausgesagt werden können. Diese Ungleichmäßigkeit der Wirkung steht im vollen Gegensatz zu der regelmäßigen steilen und flüchtigen Steigerung der Verbrennungen unter Adrenalin.

Phenyl-Butyl-Suprifen ließ den oxydativen Umsatz 2mal völlig unbeeinflußt, steigerte ihn 6mal um 21—95%, im Mittel um 60%. Jedoch gingen in 2 Versuchen der Steigerung Senkungen von 10 und 15% voraus. Alle diese Zahlen beziehen sich auf die 1. Injektion.

Beim Phenyl-Butyl-Adrenalin ist die 2phasige Wirkung auf den Herzstoffwechsel die Regel; auf eine flüchtige Senkung folgte eine nachhaltige und starke Steigerung (in 4 von 6 Versuchen). In 2 weiteren Versuchen erfolgte nur ein Anstieg des Herzstoffwechsels.

5. *Die Güte der Coronardurchblutung* ist durch den reziproken Wert der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz definiert[10]. Je geringer die capillare Sauerstoffentnahme im Herzmuskel ist, desto höher ist die Güte der Kranzgefäßdurchblutung.

Das Phenyl-Butyl-Suprifen ist durch eine zweiphasige Wirkung auf die Güte der Kranzgefäßdurchblutung ausgezeichnet, wenigstens bei der ersten Injektion. Auf eine flüchtige Verbesserung der Güte, die weniger als 1 min dauert, folgte in 5 von 8 Versuchen eine anhaltende, wenn auch meist geringe Verschlechterung der Güte der Kranzgefäßdurchblutung. Nur in 3 Versuchen fehlte die 2. Phase, die Güte blieb anhaltend verbessert; in einem Versuch kehrte sie nur auf den Vorwert zurück.

Beim Phenyl-Butyl-Adrenalin ist die Zweiphasigkeit des Einflusses auf die Güte ebenfalls die Regel. In den ersten 30—40 sec geht die Güte der Kranzgefäßdurchblutung teils steil, teils flach in die Höhe, dann folgt eine erhebliche und lang anhaltende Verschlechterung der Güte.

6. *Der Wirkungsgrad der Herzarbeit.* Von der im Herzmuskel umgesetzten Energie tritt nur ein geringer Teil als mechanische Arbeit auf. Der Wirkungsgrad gibt die Höhe dieses Anteils an. Er beträgt am nichtinnervierten Herz-Lungen-Präparat 5—20%. Als Ausgangspunkt für unsere Bewertung dient auch hier das Adrenalin, welches in der 1. min seiner Wirkung den Wirkungsgrad verbessert, in der 2.—4. min erheblich verschlechtert.

Auch beim Phenyl-Butyl-Suprifen ist die zweiphasische Beeinflussung des Wirkungsgrads die Regel. Sie unterscheidet sich aber von der Adrenalinwirkung dadurch, daß die Spitze der flüchtigen Verbesserung wesentlich niedriger ist, und zum anderen dadurch, daß die Verschlechterung sich viel langsamer durchsetzt und länger anhält. Ausnahmen von dieser Regel bildeten 3 Versuche, in denen der Wirkungsgrad ohne Übergang in eine 2. Phase nachhaltig mäßig erhöht blieb.

Das Phenyl-Butyl-Adrenalin ist insofern verschieden, als bei ihm die flüchtige initiale Verbesserung des Wirkungsgrades nur in 3 von 6 Versuchen zu erkennen war, während sie in den anderen 3 Versuchen ausfiel. Die deutliche Verschlechterung des Wirkungsgrades war in diesen 3 letzten Versuchen von vornherein ausgeprägt, in den anderen 3 Versuchen stellte sie die anhaltende Spätphase dar.

7. *Die Herzwirkung wiederholter Injektionen.* Wir berichten hier nur über die Beobachtungen mit dem Phenyl-Butyl-Suprifen, die besonders zahlreich sind.

Zunächst die *dynamische Wirkung*; sie ist bei der 2. Injektion bereits erschöpft. Weder das diastolische Volumen, noch der Druck im rechten Vorhof werden noch beeinflußt. Die fördernde sympathicomimetische Wirkung auf die Dynamik fehlt. Dieser Ausfall kann nicht darauf bezogen werden, daß noch eine erkennbare sympathicomimetische Dauerwirkung des Stoffs von der 1. Injektion her anhält.

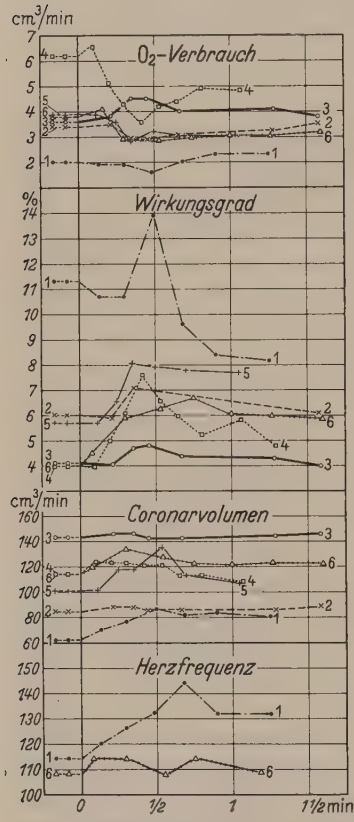


Abb. 3. Einfluß wiederholter Injektionen von Phenyl-Butyl-Suprifen an ein und demselben Herzen (Herz-Lungen-Präparat). (Numerierung gibt die Reihenfolge der Injektionen an.)

Anders bei der *Frequenz*: Oft hält die Herzbeschleunigung von der 1. Injektion her sehr lange an. Das Fehlen einer beschleunigenden Wirkung auf die Herzfrequenz oder ihre geringe Ausprägung bei der 2. und bei allen späteren Injektionen des Mittels ist nicht einer noch anhaltenden Herzbeschleunigung zuzuschreiben. Bei einigen Herzen kommt bei den späteren Injektionen gelegentlich sogar eine verlangsamende Wirkung zur Geltung.

Der *venöse Ausfluß aus dem Coronarsinus* (Abb. 3) nahm bei der 4., 5. und 6. Injektion erheblich, bei der 2. und 3. Injektion geringer zu. Die sympathicomimetische coronare Wirkung des Stoffes zeigt also keinerlei Abschwächung oder Umkehr bei seinen wiederholten Injektionen.

Die flachere Wirkung der 2. und 3. Injektion scheint dadurch verursacht, daß sie in jene Phase des denervierten Herz-Lungen-Präparates fallen, in welcher gerade der spontane Gang des venösen Coronarvolumens einer erheblichen Steigerung folgt, die während der 4.—6. Injektion sich leicht vermindert.

Ungleich ist die Wirkung der wiederholten Injektionen auf den *Sauerstoffverbrauch* des Herzens. Wird er häufig, wie auch in Abb. 3, schon bei der 1. Injektion nur geringfügig gesteigert, so kehrt sich diese Wirkung bei den folgenden Injektionen in ihr Gegenteil um. Es tritt eine teils geringe (2. Injektion), teils erhebliche (4., 5., 6. Injektion) Verminderung des oxydativen Umsatzes auf.

Nur die 3. Injektion machte in Abb. 3 eine ungeklärte Ausnahme, indem sie in der 1. und 2. min steigernd wirkte. Der spontane Gang des Sauerstoffverbrauchs im denervierten Herz-Lungen-Präparat, seine anfängliche Zunahme und spätere

Verminderung ist für die Phenyl-Butyl-Suprifen-Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch ohne Bedeutung.

Der *Wirkungsgrad* zeigt bei der Wiederholung der Injektionen eine deutliche Tendenz, die Besserung durch das Phenyl-Butyl-Suprifen festzuhalten, so daß in Abb. 3 die spätere Phase der jeweiligen Verschlechterung bei der 2., 3., 5. und 6. Injektion ganz ausfiel, während sie bei der 3. Injektion aus ungeklärten Gründen ausgeprägt auftrat.

8. Die Herzwirkung während einer Adrenalindauerinfusion. Nachdem wir die Wirkung der zwei geprüften Sympathicomimetica am Herzen als eine adrenalinähnliche kennen gelernt hatten, legte sich uns die Frage vor, ob eine Vorbehandlung des Herzens mit dem physiologischen Sympathicomimeticum Adrenalin die Wirkung der geprüften Stoffe abschwächen oder umkehren könne.

Wir setzten also in mehreren Versuchen gutarbeitende Herz-Lungen-Präparate ohne irgendwelche andere vorausgegangene Maßnahme unter eine Adrenalindauerinfusion (10—20 min). Injizierten wir jetzt Phenyl-Butyl-Suprifen, so zeigte sich, daß die Vorbehandlung die Wirkung des Phenyl-Butyl-Suprifens nicht vorweggenommen hatte. Die adrenalinartigen Herzwirkungen der Substanz waren keinesfalls abgeschwächt, eher etwas verstärkt ausgeprägt; insbesondere fehlten die launenhaften unvoraussehbaren individuellen Abweichungen von der Adrenalinwirkung. Der Druck im rechten Vorhof nahm um 5% ab, die Herzfrequenz stieg um 24%, der venöse coronare Ausfluß um 43%, der Sauerstoffverbrauch des Herzens um 66%. Dementsprechend verschlechterte sich der Wirkungsgrad von vorher 8,0 auf 4,3%.

Wurde unter fortlaufender Adrenalinfusion die Injektion von Phenyl-Butyl-Suprifen wiederholt, so zeigte die 2. Injektion noch denselben adrenalinartigen und keinesfalls abgeschwächten Wirkungsverlauf. Erst bei der 3. Injektion von Phenyl-Butyl-Suprifen schlug die Wirkung um. Die noch stark gesteigerte Herzfrequenz nahm jetzt um 15% ab, der noch gesteigerte Sauerstoffverbrauch ging nicht mehr weiter in die Höhe, der coronare Ausfluß nahm nicht mehr zu. Auch die dynamische Wirkung war erschöpft. Dabei handelte es sich jedoch nicht um den Eintritt einer Herzschwäche. Denn unter der noch fortdauernden Adrenalinwirkung war der Druck im rechten Vorhof noch immer leicht im Sinken, während das Herzminutenvolumen sowie der Druck in der Aorta und in der Pulmonalis unverändert blieben.

Besprechung der Ergebnisse.

Die von uns untersuchten Stoffe, die aus einem Umbau der Seitenkette der adrenalinartigen Wirkstoffe entstehen, zeigten nach unseren Ergebnissen am isolierten Herzen des denervierten Herz-Lungen-Präparates keine Umkehr der Herzwirkung verglichen mit der Wirkung

des Adrenalins. Külz und Schneider sprechen mit Recht von einem Sympathicomimeticum mit peripher gefäßerweiternden Eigenschaften.

Wir finden, daß es sich hier um eine Stoffgruppe handelt, die an den *peripheren Gefäßen* eine *Erweiterung* und damit eine Umkehr der sympathicomimetischen vasoconstrictorischen Wirkung hervorruft, *am Herzen* aber ein Wirkungsbild zustande bringt, welches zwar durch ungewöhnliche individuelle Variabilität auffällt, in seinen Grundzügen aber doch die *sympathicomimetische Förderung von Dynamik und Energetik* entwickelt. In diesem differenzierten Wirkungsbild an Herz und Peripherie liegt der erstrebte therapeutische Wert der Stoffgruppe.

Was die hier untersuchte Herzwirkung betrifft, so kann man einen Vorteil der Herzwirkung dieser Stoffe darin erblicken, daß sie in ihrem Beginn und auf ihrer Spitze weniger stürmisch verläuft und in ihrer Dauer nachhaltiger bleibt, verglichen mit derjenigen des Adrenalins. Da es bei der eintretenden peripheren Gefäßerweiterung von größter Bedeutung ist, eine Kreislaufförderung mit Hebung des Herzminutenvolumens und mit Verbesserung der Blutversorgung des Herzens zustande zu bringen, so muß in der erhaltenen sympathicomometischen Förderung der Dynamik und Energetik des Herzens durch diese Stoffe eine Voraussetzung für die Erfüllung des peripheren Kreislaufanspruchs gesehen werden. Da weiterhin die periphere gefäßerweiternde Wirkung sich durch eine lange Dauer auszeichnet, so ist die Stetigkeit und Dauer der Förderwirkung am Herzen ein unbedingtes Gebot, welches diese Stoffgruppe erfüllt.

Was das *am Herzen und in der Peripherie entgegengesetzte Wirkungsbild* der untersuchten sympathicomimetischen Stoffgruppe mit peripher erweiternder Gefäßwirkung betrifft, so haben wir es noch dem pharmakologischen Einfluß der *hydrierten Mutterkornalkaloide* gegenüberzustellen. Die hydrierten Mutterkornalkaloide (Rothlin und Cerletti[9]) entfalten an Herz und Peripherie ebenfalls einen entgegengesetzten Einfluß. Der Gegensatz bezieht sich aber auf die Quantität, nicht auf die Qualität der Wirkung. Am Herzen und in der Peripherie entfalten die hydrierten Mutterkornalkaloide eine gleichgerichtete Adrenolyse. Ein Gegensatz liegt vor in deren Stärke an den beiden Wirkungsorten. Die adrenolytische verengernde Wirkung an den Coronararterien, die durch Adrenalin erweitert werden, ist nach Rothlin 10mal schwächer als die adrenolytische erweiternde Wirkung an den peripheren Arterien, welche durch Adrenalin verengert werden. So wird an der Herzdurchblutung die Hemmung der Förderwirkung viel schwächer dosiert als an den peripheren Gefäßen die Hemmung der Konstriktion. Rothlin nennt dies ein typisches Beispiel funktioneller Differenzierung biologisch analoger Substrate des höher entwickelten Organismus, welche eine sinnvolle Anpassung der Herzleistung an die periphere Erweiterung der Strombahn garantiert.

Das Ziel einer *Anpassung der Herzleistung an die Erweiterung der peripheren Strombahn* wird von den hier untersuchten Stoffen dadurch erreicht, daß ihre fördernde sympathicomimetische Wirkung am Herzen ungeschwächt erhalten bleibt, während sie in der Peripherie der

sympathischen Gefäßverengerung entgegenwirken und eine Gefäßerweiterung herbeiführen. Sie zeichnen sich durch einen echten Gegensatz der Qualität ihrer Wirkung am Herzen und in der Peripherie aus und erfüllen damit ihr therapeutisches Ziel sozusagen auf direktem Wege.

Was die therapeutische Verwendung der untersuchten Stoffe betrifft, so zeigen unsere Untersuchungen, daß diese Stoffe, wenn sie ihr therapeutisches peripheres Ziel erreichen, keine Gegenanzeige durch die Eigenart ihrer Wirkung am Herzen erfahren, sondern daß ihre fördernde Herzwirkung der sinnvollen Anpassung an die peripheren Aufgaben entspricht.

Zusammenfassung.

1. Am isolierten Herzen des entnervten Herz-Lungen-Präparates werden zwei sympathicomimetische Stoffe mit peripher gefäßerweiternder Wirkung (Phenyl-Butyl-Suprifen sowie Phenyl-Butyl-Adrenalin) auf ihre dynamische und energetische Herzwirkung untersucht.

2. Die untersuchten Stoffe, die durch Substitution in der Seitenkette der adrenalinartigen Wirkstoffe gekennzeichnet sind, entfalten am isolierten Herzen folgende Wirkungen: Sie verkleinern das diastolische Herzvolumen, sie senken den Druck im rechten Vorhof, sie steigern das Herzminutenvolumen, sie erhöhen die Herzfrequenz, sie vermehren den oxydativen Umsatz im Herzmuskel und sie verbessern die Blutversorgung des Herzmuskels. Am Wirkungsgrad der Herzarbeit entfalten sie eine Verschlechterung, die aber für das unversehrte Tier nicht zutrifft und daher therapeutisch nicht zu fürchten ist.

3. An Herzen, die unter einer Adrenalindauerinfusion stehen, ist die fördernde Wirkung der Stoffe auf die Dynamik und Energetik des Herzens nicht vermindert.

4. Die Wiederholung der Injektionen schwächt die Förderwirkung am Herzen stark ab, unter Umständen bis zum Erlöschen. Hingegen bleibt die verbessernde Wirkung auf das coronare Stromvolumen bei wiederholten Injektionen gut erhalten.

Literatur.

[1] Külz, F., u. M. Schneider: Klin. Wschr. **31/32**, 535 (1950). — [2] Wiemers, K.: Med. Klin. **45**, 453 (1950). — [3] Ostwald, E.: Med. Klin. **45**, 733 (1950). — [4] Bumm: Dtsch. med. Wschr. **75**, 1627 (1950). — [5] Gollwitzer-Meier, Kl., K. Kramer u. F. Krüger: Pflügers Arch. **237**, 5 (1936). — [6] Hampel, A., u. H. Rein: Pflügers Arch. **244**, 171 (1940). — [7] Evans, C. L., u. H. E. Starling: J. of Physiol. **46**, 413 (1913). — [8] Kramer, K.: Z. f. Biol. **96**, 61 (1935). — [9] Rothlin, U., u. A. Cerletti: Verhandlungen der Dtsch. Ges. f. Kreislaufforschung 1949, S. 158. — [10] Gollwitzer-Meier, K., u. Chr. Kroetz: Pflügers Arch. **241**, 249 (1938).

Prof. Dr. Kl. Gollwitzer-Meier, Hamburg 13, Harvestehuderweg 39.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 358—366 (1952).

Aus der I. Med. Abt. (Chefarzt: Prof. Dr. H. W. Bansi) und dem Chem.-Physiolog. Inst. (Leiter: Dr. F. Fretwurst) des Allgem. Krankenhauses St. Georg in Hamburg.

Zur Technik der Flammenfotometrie in der Klinik.

Von

W.-D. v. Schönberg.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 2. November 1951.)

Die moderne klinische Diagnostik erfordert in zunehmendem Maße quantitative Analysen der (Erd-)Alkalimetalle Calcium, Natrium und Kalium in biologischen Medien. Häufig handelt es sich dabei um ausgesprochene Reihenuntersuchungen, die das Flammenfotometer einfach, schnell und zuverlässig vorzunehmen gestattet.

Die Flammenfotometrie beruht auf der fotoelektrischen Messung von charakteristischen Linien oder Banden der Emissionsspektren von Metalldämpfen. Zu diesem Zweck ist eine ganze Anzahl von Apparaten entwickelt worden (Perkin-Elmer, Weichselbaum-Varney, Beckmann, Barclay, Lange-Riehm, Zeiss u. a.). In Deutschland hat bisher vor allem das Gerät von Zeiss praktische Bedeutung für die Klinik gewonnen. Seine Entwicklung ist aber — ebensowenig wie die anderer Typen — zur Zeit noch nicht abgeschlossen und die Arbeit mit ihm erfordert noch ein erhebliches Maß an praktischer Erfahrung.

An unserem Institut hat sich eine Arbeitsweise entwickelt und bewährt, von der wir glauben, daß sie mit Nutzen bei allen derzeitigen deutschen Flammenfotometern in der Klinik Anwendung finden kann.

Das Gerät arbeitet mit einem Acetylen-Preßluftgemisch, welches Flaschen entnommen und über Druckminderer dem Zerstäuber-Brennersystem zugeführt wird. Im Zerstäuber wird die zu untersuchende Flüssigkeit vernebelt und anschließend in der Flamme verdampft. Geeignete Filter lassen jeweils nur noch Licht eines bestimmten Wellenbereichs durchtreten, dessen Intensität von einem Selensperrschichtelement (SSE) mit Hilfe eines empfindlichen Galvanometers gemessen wird. Hierbei ist die Intensität der Lichtemission in bestimmten Grenzen der Konzentration des zu bestimmenden Ions in der Lösung proportional. Man vergleicht mit Eichlösungen bekannter Konzentration.

Eine wesentliche Schwierigkeit aller Messungen in „unreinen" Lösungen (wie Serum, Urin usw.) liegt nun darin, daß sich verschiedene Kat- und Anionen, welche etwa gleichzeitig in der Lösung anwesend sind, gegenseitig zu beeinflussen vermögen, so daß beispielsweise die Konzentration einer reinen Natriumlösung niedriger gefunden wird als nach Zusatz von Kalium (Ionenbeeinflussung). Dieses Phänomen muß bei den Messungen besonders in der Klinik berücksichtigt werden.

Das kann z. B. durch den Zusatz von Lithium sowohl zu den Eichlösungen wie zu den Meßlösungen geschehen. Die Differenz der (gleichgroßen) Lithium-

konzentrationen wird nach dem Prinzip der homologen Linien als durch „Ionenbeeinflussung" entstanden betrachtet und zur Korrektur des in der Meßlösung gefundenen Wertes verwandt. Mit einem solchen sogenannten „internal standard" arbeitet beispielsweise das Gerät von Perkin-Elmer, während es in Deutschland solche Apparate noch nicht gibt. Für Reihenuntersuchungen ist aber auch der immer wiederkehrend notwendige exakte Zusatz einer abgemessenen Menge von Lithium zu den Meßlösungen zu zeitraubend.

Da es nach unseren Erfahrungen praktisch genügt, die Beeinflussung durch die Kationen Natrium und Kalium zu berücksichtigen (vgl. auch Belke und Dierkesmann), kann man sich in der nachfolgend beschriebenen Weise sehr einfach dadurch helfen, daß man sie den verwendeten Eichlösungen entsprechend den in biologischen Flüssigkeiten gegebenen Konzentrationsrelationen zusetzt.

I. Die Vorbereitung der Lösungen.

1. Stammlösungen.

Es ist zweckmäßig, Lösungen der folgenden Konzentrationen durch genaue Einwaage und daraus durch weitere Verdünnung die Eichlösungen herzustellen:

0,1%ige	Natriumlösung	= 2,5418 g	NaCl p.a./1000 ml
1,0%ige	„	= 25,4181 g	NaCl p.a./1000 ml
0,1%ige	Kaliumlösung	= 1,9069 g	KCl p.a./1000 ml
1,0%ige	„	= 19,0692 g	KCl p.a./1000 ml
0,1%ige	Calciumlösung	= 2,4972 g	$CaCO_3$ p.a. + 50 ml n-HCl/1000 ml

Die Aufbewahrung geschieht am besten in Flaschen aus Jenaer Glas, da gewöhnliches Glas im Laufe der Zeit etwas Natrium bzw. Kalium abgibt. Sonst hilft man sich, indem man in die Flaschen mehrere Stunden lang Dampf einleitet. Paraffinieren ist unzweckmäßig, weil abgelöste Paraffinteilchen die Zerstäuberdüse verstopfen können.

2. Eichlösungen.

Theoretisch ist es möglich, den Verlauf der Eichkurven ein für alle Mal festzulegen und jeweils bei den Messungen diese Kurven durch Bestimmung eines Eichpunktes zu korrigieren. Dieses Verfahren hat sich uns nicht bewährt, vielmehr verringert die Verwendung einer „Eichreihe" die durch Ablesefehler entstehenden Ungenauigkeiten.

Zur Berücksichtigung der Ionenbeeinflussung kann man — abgesehen von der Verwendung eines „internal standard" — die störenden Ionen sowohl den Eich- als auch den Meßlösungen in so hoher Konzentration zusetzen, daß der Eigengehalt der Meßlösung demgegenüber zu vernachlässigen ist. Für die meisten klinischen Zwecke kommt man aber mit den folgenden Eichreihen aus, welche einen Zusatz zur Meßlösung nicht erfordern:

a) Serum- und Liquormessungen.

aa) *Natrium*: Bei einer Verdünnung des Serums im Verhältnis 1 : 100 mit Aqua dest. (s. auch Meßlösungen) entsprechen Konzentrationen der Eichlösungen von 2,5—3,5 mg% Na dem praktisch in Frage kommenden Meßbereich. Die Beeinflussung durch Kalium kann bei dieser Verdünnung vernachlässigt werden.

bb) Kalium und Calcium: Hierbei muß die mittlere Serum*natrium*konzentration von ca. 300 mg% berücksichtigt werden.

Bei einer Verdünnung des Serums im Verhältnis von 1 : 20 mit Aqua dest. sollen die Konzentrationen der Eichlösungen 0,5; 1,0; 1,5 + 2 mg% Kalium, 0,25; 0,5 + 0,75 mg% Calcium plus jeweils 15 mg% Natrium betragen.

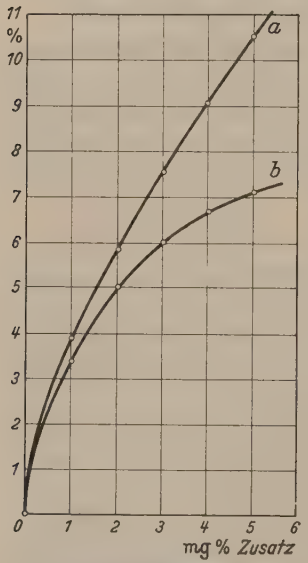


Abb. 1. „Ionenbeeinflussung." a) Zunahme der Lichtemission einer Kaliumlösung konstanter Konzentration durch Zusatz von 0—5 mg% Natrium, (in Prozent). — b) Zunahme der Lichtemission einer Natriumlösung konstanter Konzentration durch Zusatz von 0—5 mg% Kalium.

b) Urinmessungen.

Hierbei kann man leider nicht mit so konstanten Ionenrelationen rechnen wie im Serum. Untersucht man jedoch den Fehler, welcher dadurch bei der Messung entsteht, daß beispielsweise einer Kaliumlösung bestimmter Konzentration steigende Konzentrationen (0—5 mg%) Natrium hinzugefügt werden, so zeigt sich, daß z. B. durch 5 mg% Natrium ein Fehler von plus 10% K entsteht. Umgekehrt — bei der Beeinflussung des Natriums durch das Kalium — liegen die Verhältnisse noch günstiger. Man setzt deshalb der Eichlösung das störende Ion in der Konzentration zu, welche gerade einen Fehler von plus 5% gegenüber der reinen Eichlösung bewirkt. Das sind für die Kaliumeichreihe 2 mg% Natrium, für die Natriumeichreihe 2 mg% Kalium. Der entstehende Fehler kann dann nie mehr als 5% betragen, was für Messungen im Urin gut tragbar erscheint — praktisch ist er aber meist wesentlich kleiner (vgl. auch Abb. 1). Die geringen Urincalciumkonzentrationen stören nicht.

Da die Kaliumeichkurve gradlinig verläuft, kommt man mit 3 Eichpunkten aus, während man beim Natrium besser 5 Punkte nimmt. Bei einer Verdünnung des Urins im Verhältnis von 1 : 100 mit aqua dest. sollen die beiden Eichreihen einem Meßbereich von 0—500 mg% Na bzw. K entsprechen. In den sehr seltenen Fällen, in denen sich höhere Konzentrationen finden, muß man den Urin 1 : 200 verdünnen.

Im Verhältnis zu Natrium und Kalium sind die im Urin ausgeschiedenen Calciummengen klein und es treten deshalb unberechenbare Störeffekte durch die beiden ersteren Ionen auf. Will man das Ca trotzdem flammenfotometrisch bestimmen, dann ist die vorherige Fällung als Oxalat notwendig.

Die 3 mg% Kalium enthaltende Eichlösung verwendet man zweckmäßig zum „Einbrennen" (s. d.) des Fotoelementes. Man verschließt zu diesem Zweck eine 2—5 l-Flasche mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen durch dessen eine Öffnung man ein ca. 3 mm starkes Steigerohr bis zum Boden führt. Die andere

Öffnung wird durch ein kurzes Rohr verschlossen, dessen freies Ende man zur Vermeidung von Verdunstung zu einer feinen Düse auszieht. Dann verbindet man zum Einbrennen das Steigerohr durch einen starrwandigen nicht zu langen Schlauch mit der Ansaugcapillare des Zerstäubers.

c) Erythrocytenmessungen.

Zur Kaliumbestimmung im Erythrocyten verwendet man die gleiche Eichreihe wie zur Kaliummessung im Urin, nur ohne Zusatz von Natrium.

Zur Herstellung der Eichlösungen darf nur mit geeichten Vollpipetten und geeichten Meßkolben gearbeitet werden. Die Pipetten stellt man zuvor für mindestens 24 Std in eine mit Kaliumbichromat gesättigte Lösung von konz. Schwefelsäure ein und spült und trocknet dann sorgfältig in der üblichen Weise. Pipettenfehler machen sich bei den starken Verdünnungen sehr unangenehm bemerkbar.

Die Eichlösungen werden in entsprechend vorbehandelten Literflaschen aufbewahrt. Für die Eichung selbst hält man außerdem eine Reihe von 25—50-ml-Flaschen mit eingeschliffenem Glasstöpsel bereit, deren Inhalt jeweils nach der Eichung verworfen wird, da eine geringe Verunreinigung durch der Ansaugcapillare anhaftende Flüssigkeitsmengen unvermeidbar ist.

3. Meßlösungen.

Die zu messenden Flüssigkeiten müssen aus zwei Gründen vor der Messung in einem geeigneten Verhältnis mit Aqua dest. verdünnt werden (Erythrocyten werden dabei gleichzeitig hämolysiert). Einmal ist es notwendig, damit die zu erwartenden Ionenkonzentrationen innerhalb des optimalen Meßbereiches des Flammenfotometers liegen, zum anderen aber auch, damit etwaige Viscositätsunterschiede zwischen Meßlösungen und Eichlösungen beseitigt werden (Sera). Letztere fallen bei einer Verdünnung von 1 : 20 mit Aqua dest. nicht mehr spürbar ins Gewicht.

a) Serum- und Liquor cerebrospinalis.

Serum und Liquor werden zur Natriummessung im Verhältnis 1 : 100, zur Kalium- und Calciummessung im Verhältnis 1 : 20 mit Aqua dest. verdünnt. Die Verwendung geeichter Vollpipetten ist dabei zur Erzielung reproduzierbarer Resultate unerläßlich.

Die Blutentnahme und Verarbeitung zur Bestimmung von Kalium im Serum bedarf besonderer Sorgfalt: Die venöse Stauung muß möglichst schwach sein und die Venenpunktion, sowie die Entnahme müssen rasch, glatt und ohne Hämatombildung vor sich gehen, da im anderen Falle durch Austritt von Kalium aus den Erythrocyten zu hohe Serumwerte vorgetäuscht werden. Aus dem gleichen Grunde muß das entnommene Blut *unmittelbar nach dem Erkalten* 2mal (nicht allzu scharf) zentrifugiert werden.

b) Urin.

Verdünnung im Verhältnis 1 : 100 zur Kalium- und Natriumbestimmung. Zur Calciummessung vgl. S. 360.

c) Erythrocyten.

aa) Kalium: Der quantitativen Bestimmung von Kalium im Erythrocyten kommt zur Erfassung eines Gewebsdefizits praktische Bedeutung zu. Man verwendet sorgfältig graduierte Spezialröhrchen, welche ca. 5 ml fassen und in die Zentrifuge passen müssen. Das schlanke Unterteil von ca. 1,2 ml Fassungsvermögen wird auf 0,02 ml genau unterteilt.

Man beschickt das Röhrchen mit 2 ml heparinisierten Blutes (1 Tropfen auf 5 ml Blut) und zentrifugiert scharf für eine ½ Std. Dann saugt man das überstehende Serum und einen Teil der Erythrocyten bis etwa zur Marke 0,5 ab und zentrifugiert nochmals kurz zur Einstellung einer glatten Oberfläche. Hierauf wird das Erythrocytenvolumen abgelesen (und in Rechnung gestellt). Eine Waschung der Erythrocyten ist nicht erforderlich, da die Serumkaliumkonzentration gegenüber der hohen Kaliumkonzentration im Erythrocyten vernachlässigt werden kann. Man hämolysiert nun durch Auffüllen des Röhrchens mit Aqua dest.; nach Durchmischung wird der Inhalt in ein Meßkölbchen von 100 ml entleert, mehrfach nachgespült und bis zur Marke aufgefüllt. Will man den Kaliumgehalt des einzelnen Erythrocyten berechnen, so liest man das Erythrocytenvolumen *vor* dem Absaugen ab, dividiert durch 2 und erhält so einen sehr genauen Hämatokritwert (1 Tropfen Thrombovetrenzusatz zu 5 ml Blut kann im allgemeinen vernachlässigt werden). Aus diesem, sowie aus einer gleichzeitig mit der Blutentnahme durchgeführten 3maligen genauen Erythrocytenzählung und der Kaliumkonzentration pro 100 ml Erythrocyten läßt sich der Kaliumgehalt des einzelnen Erythrocyten leicht errechnen.

bb) Natrium: Der Wert der Bestimmung des Natriumgehaltes der Erythrocyten ist umstritten, weil bei Verarbeitung ungewaschener Erythrocyten immer ein verschieden großer Anteil Serumnatrium mitbestimmt wird, während bei Waschung Natrium aus dem Erythrocyten verloren geht. Man kann sich aber helfen, in dem man das Erythrocyten-Na als Differenz von Vollblut und Plasma bestimmt (Hämatokrit).

cc) Calcium: Ca ist in gewaschenen Erythrocyten nur in Spuren vorhanden.

In verdünnten Seren und Erythrocytenhämolysaten fallen nach einiger Zeit die Globuline aus, wobei Kationen mitgerissen werden können. Die Vorbereitung eiweißhaltiger Meßlösungen erfolgt deshalb am besten erst kurz vor der Messung.

Will man prüfen, ob andere im Serum usw. enthaltene Bestandteile das Meßergebnis beeinflussen, dann kann man außer der üblichen Verdünnung noch zwei weitere herstellen, welchen man beispielsweise zur Kaliummessung 0,1 und 0,2 mg Kalium pro Milliliter Serum zusetzt. Die gefundene Serumkaliumkonzentration muß dann nach Abzug der Zusätze in allen 3 Meßlösungen die gleiche sein.

Viscositätsstörungen erkennt man durch Vergleich von Verdünnungen beispielsweise von 1 : 5 und 1 : 20 des gleichen Serums mit entsprechenden Eichlösungen.

II. Die Messung.

Im folgenden sollen einige Punkte herausgegriffen werden, bei welchen sich uns ein Abweichen von den üblichen Bedienungsanweisungen für Flammenfotometer bewährt hat:

Flammenfotometer wurden — besonders in Deutschland — bis vor kurzem fast nur in landwirtschaftlichen Instituten für Bodenanalysen verwandt. Den in der Klinik zu fordernden Genauigkeitsansprüchen werden deshalb Geräte ohne Verstärkeranlage für den Fotostrom infolge mangelnder Empfindlichkeit nicht gerecht, während bei Geräten mit Verstärkeranlagen durch diese eine nicht unbeträchtliche Quelle von Störungen und zusätzlichen Fehlern gegeben ist. Wir haben daher versucht, die Empfindlichkeit unseres Gerätes (Zeiss, Modell III) durch möglichst einfache Maßnahmen zu steigern.

Die *Genauigkeit* der Ablesung ist von Größe und Ruhe der Galvanometerausschläge abhängig. Die Ausschlagsgröße wird natürlich vor

allem von der Empfindlichkeit des Fotoelementes, der Durchlässigkeit der Filter und der Stromkonstante des Galvanometers bestimmt, in geringerem Maße jedoch auch von dem Arbeitsdruck der Gase und der Weite der Zerstäuberdüse. Der Preßluftdruck kann nämlich nicht beliebig gesteigert werden, weil sonst die Luft bei Austritt aus der Düse Schallgeschwindigkeit erreichen kann („kritischer" Druck); es treten dann „Verdichtungsstöße" auf, welche zusätzliche Ausschlagsschwankungen bewirken. Durch Verwendung eines Galvanometers der Type ESG 4 von RUHSTRAT mit einer Stromkonstante von $1{,}6 \times 10^{-9}$ kann die Ausschlagsgröße wesentlich verbessert werden. Man läßt es zweckmäßig nach Bestellung so arbeiten, daß der äußere Grenzwiderstand niedriger als der innere Widerstand des Selensperrschichtelementes (ca. 25000 Ohm) ist. Man nimmt dafür eine etwas längere Schwingungsdauer in Kauf ($T_{off.}$ — 2″), welche nicht unerwünscht ist, da sie die Ausschlagsschwankungen dämpft; auf diese Weise erzielt man eine Verdoppelung der Ausschlagsgrößen.

Die serienmäßig üblichen Farbfilter ersetzt man durch Interferenzfilter (Fa. Schott) entsprechender Wellenlängen. Das hat neben einer beträchtlichen Steigerung der Ausbeute an Fotostrom bei gleicher Selektivität noch den weiteren erheblichen Vorteil, daß bei der Kaliummessung Störungen des Fotoelementes durch Wärmestrahlungen vermieden bleiben, weil das Interferenzfilter im Gegensatz zum Farbfilter kein langwelligeres Licht als das der Kaliumlinien durchläßt.

Durch Austausch von Filtern und Galvanometer läßt sich auch ohne komplizierte elektrische Verstärkeranlage die grundsätzliche Forderung erfüllen, daß bei ausreichender Selektivität eine Eichlösung mit einer Konzentration von 1 mg% Natrium, Kalium oder Calcium einen Galvanometerausschlag von nicht weniger als 100 mm bewirken soll.

Die Ausschlagsruhe wird vor allem durch technische Mängel der üblicherweise verwendeten Zerstäuber und Druckminderer beeinträchtigt; sie läßt sich durch quantitative Zusätze von Propyl- bzw. Isopropylalkohol zu den Eich- bzw. Meßlösungen etwas verbessern; gleichzeitig wird dadurch auch die Ausbeute an sogenannten „prallfesten" Nebeln und damit die Lichtemission gesteigert.

Meist sind aber solche Maßnahmen überflüssig. Der Geübte gewöhnt sich in zunehmendem Maße daran zu „mitteln", d. h. die von einem hypothetischen Ruheausschlag ungleichmäßig nach positiv und negativ erfolgenden Schwankungen ausreichend zu berücksichtigen. Durch Verwendung eines geeigneten „shunts" an dem Galvanometer, sowie Parallelschaltung eines guten Kondensators von ausreichender Kapazität kann man die Ausschläge zusätzlich dämpfen.

Eine sehr störende Eigenschaft aller Selensperrschichtelemente ist das Nachlassen ihrer Empfindlichkeit nach längerer Benutzung; man spricht dabei von einer „Ermüdung" des SSE, welcher jeweils in der

Ruhe eine entsprechende Erholungsphase folgt. Solange es keine Geräte gibt, welche mit — ermüdungsfreien — Alkalizellen arbeiten, muß man daher vor Beginn der Messungen durch Versprühen einer 3 mg%igen Kaliumlösung für ca. 1 Std das SSE maximal ermüden. Dies gelingt deshalb leider nur unvollständig, weil es nach unseren Erfahrungen nur durch einen *ständigen Wechsel* der Belichtungsintensität (und auch der Wellenlänge des verwendeten monochromatischen Lichtes) zu einer wirklich konstanten Ermüdung kommt. Man hilft sich deshalb zweckmäßig durch Verwendung eines einfachen von uns entwickelten Sechs-Wegehahns mit welchem 6 Einbrennlösungen verschiedener Konzentration in ständigem Wechsel versprüht werden können.

Um sich von diesen lästigen Erscheinungen der Ermüdung und Erholung der Fotoelemente frei zu machen ist auch empfohlen worden, nach der Stoppuhr in der Weise zu messen, daß der Schlitzverschluß immer 20 sec geöffnet und 40 sec geschlossen bleibt. Nach den ersten 20 sec soll dann die Ablesung, während der 40 sec der Wechsel der Meß- bzw. Eichlösungen erfolgen. Ermüdung und Erholung sollen auf diese Weise immer die gleiche sein. Das ist deshalb ein Trugschluß, weil diese Erscheinungen von dem Ausmaß der vorangegangenen Belichtung ebenso abhängig sind wie vom Zeitfaktor und es also nicht genügt, nur den letzteren konstant zu halten. Die Lichtemission ist aber von der Elektrolytkonzentration der Lösungen abhängig und variiert demzufolge in weiten Grenzen. Es bleibt daher keine andere Wahl, als in der beschriebenen Weise mit einem maximal ermüdeten Fotoelement zu arbeiten.

Für die gleichzeitige *Messung* von verschiedenen Kationen ist es notwendig, daß Lösungen gleicher Konzentrationen von Na, K und Ca auch etwa gleichgroße Ausschläge bewirken. Man verwendet zur Verkleinerung der übergroßen Ausschläge am besten Lochblenden, welche man den einzelnen Filtern vorsetzt. Die Irisblende am Apparat ist ungeeignet und überflüssig, weil sie nicht reproduzierbar eingestellt werden kann.

Theoretisch wäre zu erwarten, daß die *Eintauchtiefe* der Ansaugcapillare des Zerstäubers in die Eich- bzw. Meßlösungen für deren Durchströmung in der Zeiteinheit eine Rolle spielt. Tatsächlich wird auch von verschiedener Seite gefordert, daß sie peinlichst genau einzuhalten sei; man hat sogar der Capillare ein Manometer angeschlossen, um mit einem meßbar konstanten negativen Druck arbeiten zu können. Eigene eingehende Versuche haben aber gezeigt, daß man diesen Faktor dann vollkommen vernachlässigen kann, wenn man eine sehr feine Flüssigkeitsdüse verwendet. Ist deren Querschnitt gegenüber dem der Ansaugcapillare klein, dann spielt die Länge der Capillare und damit auch deren Eintauchtiefe innerhalb gewisser Grenzen keine wesentliche Rolle mehr für ihre Durchströmungsgeschwindigkeit. Es genügt somit, einfach mit der Hand die Erlenmeyer-Kölbchen derart unter den Zerstäuber zu halten, daß die Ansaugcapillare voll eintaucht, ohne den Boden zu berühren. Das bedeutet eine beträchtliche Arbeitsersparnis und der

beigegebene Meßtisch wird überflüssig, auch gelingt es auf diese Weise besser, die Lösungen so rasch zu wechseln, daß eine zwischenzeitliche Erholung des SSE vermieden bleibt.

Die *Eichung* braucht bei der Messung von Urinen nur einmal am Ende der Messung vorgenommen werden, es sei denn, man mißt mehrere 100 Lösungen in einem Arbeitsgang. Messungen von Seren bzw. Liquores erfordern eine größere Genauigkeit und damit ein etwas anderes Vorgehen. Hier empfiehlt es sich, jede einzelne Messung in der Weise „einzuschachteln", daß man unmittelbar davor die Eichlösung nächstniederer und danach diejenige nächsthöhere Konzentration versprüht. Wiederholt man dann noch die Messung 1—2 mal in vollkommen getrennten Arbeitsgängen, dann kann der Geübte seine Fehlerbreite auf weniger als 2% drücken.

Zusammenfassung.

Es wird zu zeigen versucht, wie man bei der Flammenfotometrie durch die Verwendung geeigneter Eichlösungen Meßfehler durch sogenannte „Ionenbeeinflussung" am einfachsten vermeiden kann. Ferner werden einige Vorschläge zur Verbesserung der Meßsicherheit, sowie der Handlichkeit der Methode gemacht, mit deren Hilfe es nach unserer Erfahrung gelingt, mit dem Flammenfotometer auch in der Klinik zuverlässige und der zeitraubenden chemischen Analyse an Exaktheit mindestens ebenbürtige Resultate zu erzielen, wenn man sich und seiner Methode stets mit der gebotenen Kritik gegenübersteht.

Literatur.

[1] Andes, J., u. A. G. Eaton: Synopsis of Pathological Chemistry. St. Louis 1941. — Barnes, R. B., u. D. et al. Richardson: Ind. Eng. Chem. Anal. **17**, 605 (1945). — Barnes, R. B. et al.: Eng. u. Mining J. **149**, 92 (1948). — Beckman Bulletins: National Technical Laboratories. South Pasadena, Californ. — Belke, J., u. A. Dierkesmann. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 629 (1948). — Berry, J. W. et al.: Ind. Eng. Chem. Anal. **18**, 19 (1948). — Bills, Ch. E. et al.: Analyt. Chem. **21**, 1076 (1949). — Boyle, A. J. et al.: J. Labor. a. Clin. Med. **34**, 625 (1949). — Carry, H. H., f. A. O. Beckmann: J. Opt. Soc. Amer. **31**, 682 (1941). — Cholak, J., u. D. M. Hubbard: Ind. Eng. Chem. Anal. **16**, 728 (1944). — Dunker, E., u. H. Passow: Biochem. Z. **321**, 152 (1950). — Gerlach, W.: Z. anorg. u. allgem. Chem. **142**, 383 (1925). — Gerlach, W., u. E. Schweitzer: Die chemische Emissionsspektralanalyse. Leipzig 1930. Teil I, Grundlagen und Methoden. — Gerlach, W., u. We. Gerlach: Teil II, Anwendung in Medizin, Chemie u. Mineralogie. Leipzig 1933. — Gerlach, W., u. E. Riedl: Teil III, 2. Aufl., Tabellen zur qualitativen Analyse. Leipzig 1942. — Gibb, jr., Th. R. P.: Optical Methods of Chemical Analysis. New York u. London 1942. — Gibson, K. S., u. M. M. Balevlin: Research Paper RP **38**, 1798 (1947). — Giesecke, P.: Amer. Inst. Mining Met. Engrs., Tech. Pub. **1944**, 1740. — Gilbert, P. T. et al.: Analyt. Chem. **22**, 772 (1950). — Hald, P. M.: J. of Biol. Chem. **167**, 499 (1947). — Kapitel in: Methods in Medical Research. Band IV. New York: The Year Book Publishers 1951 (in Druck). — Howard, J. E., u.

R. S. Bigham: Conf. on Metabol. Aspects of Conval., 11th Meet., 10. New York: Josiah Macy Jr. Found. 1945. — Jantz, H.: Nervenarzt **18**, 360 (1947). — Kramer, B., u. F. F. Tisdall: J. of Biol. Chem. **46**, 339 (1921). — Kaye, J. A.: Ind. Chem. **12**, 310 (1940). — Levinson, S. A., u. R. P. McFate: Clinical Laboratory Diagnosis. Philadelphia 1943. — Leppänen, V. et al.: Scand. J. clin. Lab. Invest. **3/1**, 23 (1951). — Löwe, F.: Optische Messungen des Chemikers u. Mediziners. Techn. Fortschr.berichte. Band 6. Th. Steinkopff 1949. — Lundegardh, H.: Die quantitat. Spektralanalyse der Elemente. Teil I u. II. Jena: G. Fischer 1929—1934. — Lundegardh, H., Ann. Lantbruks-Högskol: **3**, 49 (1936); Ann. **5**, 249 (1938). — Marins, T. P. et al.: J. Labor. a. Cl.n. Med. **32**, 1208 (1947). — Mosher, R. A. et al.: Amer. J. Clin. Path. **19**, 461 (1949). — Natelson, S.: Amer. J. Clin. Path. **20**, 463 (1950). — v. Oer u. Höfert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (in Druck). — Overmann, R. R., u. A. K. Davis: J. of Biol. Chem. **168**, 641 (1947). — Parks, T. D. et al.: Analyt. Chem. **20**, 822 (1948). — Perkin-Elmer Corp., Conn. Norwalk: Instruction Manual 52-C. — Peters, J. P., u. D. D. van Slyke: Quant. Clin. Chemistry, Methods, p. 741. Baltimore 1932. — Rauterberg, E., u. E. Knippenberg: Z. Bodenkunde **20**, 364 (1941). — Riehm, H.: Z. anal. Chem. **128**, H. 2/3 (1948). — Ryssing, E.: Scand. J. clin. Lab. Invest. **3/1**, 17 (1951). — Schuhknecht u. Waibel: Angew. Chem. **50**, 299 (1937). — Severinghaus, J. W., u. J. W. Ferrbee: J. of Biol. Chem. **187/2** (1950). — Sewig: Objektive Photometrie. Berlin: Springer 1935. — Smith, D. M.: Spectrochim. Acta **3**, 89 (1947). — Spencer, A. G.: Lancet **1950**, 623. — Todd, J. C., u. A. H. Sanford: Clin. Diagn. by Lab. Methods. Philadelphia 1943. — Turner, A. F., u. O. A. Ullrich. J. Opt. Soc. Amer. **38**, 662A (1948). — Wallace, W. M. et al.: J. Labor. a. Clin. Med. **37**, 621 (1951). — Waibel, H.: Z. techn. Physik **15**, 454 (1934). — Weichselbaum, T. E., u. P. L. Varney: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **71**, 570 (1949). — [39] West, P. Analyt. Chem.) **22**, 667 (1950).

Dr. W.-D. von Schönberg,
I. Med. Abt. des Allgem. Krankenhauses St. Georg in Hamburg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 367—373 (1952).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg.

Über eine Methode zur Messung der Leitungsgeschwindigkeit der Erregung im Froschherzstreifen zur Prüfung pharmakologischer Substanzen.

Von

H. Bammer und K. E. Rothschuh.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. Oktober 1951.)

Angesichts der wichtigen Rolle, welchen der Vorgang der Erregung in der Tätigkeit des gesunden und kranken Herzens spielt, ist es erwünscht, eine zuverlässige Methode zur Prüfung der Geschwindigkeit der *Erregungsleitung* zu besitzen. Dieser Vorgang ist aufs engste verknüpft mit der Grenzflächenladung der Membranen und mit der Erregbarkeit des Organs, wie näher in der jüngst erschienenen Monographie „Elektrophysiologie des Herzens" (K. E. Rothschuh[1]) ausgeführt wurde. Die Messung der Leitungsgeschwindigkeit läßt sich daher als Test für die Auswirkung der verschiedensten Eingriffe auf den Herzmuskel verwenden. Während man mit der Mikro-Elektroden-Methode von H. Schaefer und W. Trautwein[2] die Geschwindigkeit der Erregungsleitung am ganzen innervierten Herzen messen kann, ermöglicht die im Folgenden beschriebene Methode am Herzstreifenpräparat, die Erregungsleitung im Muskel-Syncytium nach Lösung aus dem hämodynamischen Zusammenhang und nach Unterbrechung der vegetativen Nerveneinflüsse zu verfolgen und erlaubt es, die Messung der Leitungsgeschwindigkeit im Froschherzstreifen als Routinemethode der Pharmakologie anzuwenden.

1. Herstellung und Behandlung des Präparates.

Um einen möglichst langen Herzstreifen aus der Froschherzkammer zu gewinnen, wenden wir nach dem Vorgehen von K. E. Rothschuh[3] eine *spiralige Schnittführung* an. Wir trennen zunächst den Vorhof des isolierten Herzens gänzlich ab. Dann machen wir mit einer möglichst feinen Schere einen ersten Einschnitt durch die Basismuskulatur und führen dann den weiteren Schnitt parallel zur Vorhofkammergrenze so durch die ganze Kammerwand, daß ein etwa 1—2 mm breiter Streifen entsteht. Sein Anfang wird mit einem Bindfaden angeschlungen, der in der Hand gehalten wird und eine Fixierung des Herzens beim Schneiden gestattet. Die weitere Schnittführung verläuft dann in spiraligen Gängen um die ganze Circumferenz der Kammer herum. Wenn wir an der Spitze angelangt sind, haben wir einen 4—8 cm langen Streifen gewonnen. Auch das Spitzenende wird mit

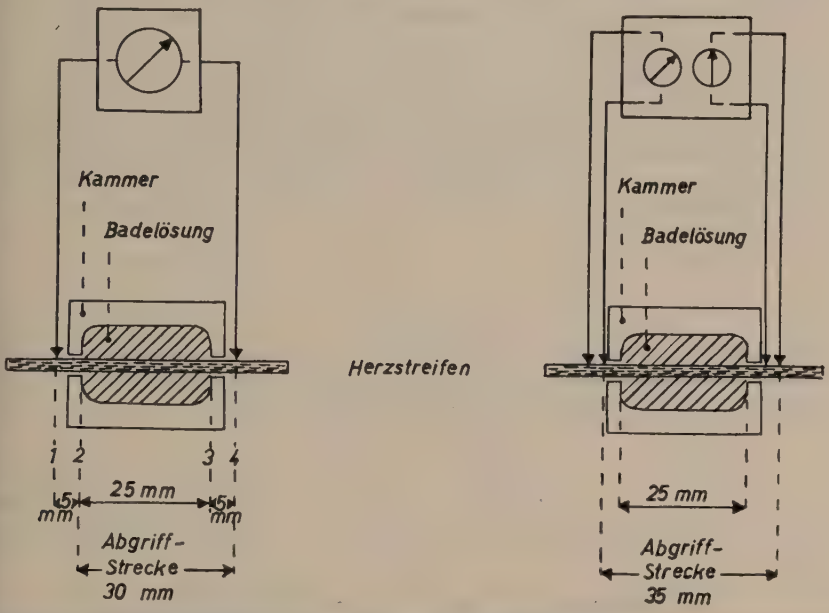
einem Bindfaden angeschlungen. Alle Reste des reizbildenden Trichtergewebes, welches gut an dem blaßweißen Aussehen makroskopisch erkennbar ist, werden entfernt. Dasselbe gilt von überflüssigen Anteilen der spongiösen Muskelbälkchen, welche besonders an der Herzspitzenregion sonst eine störende, ungleichmäßige Dicke erzeugen. So erhält man ein nicht mehr spontantätiges Kammerstreifenpräparat von etwa 1—2 mm Breite und etwa 1 mm Dicke. Anschließend wird der Streifen, dessen Enden mit den Bindfäden an Stecknadeln befestigt wurden, für mindestens 30 min in eine mit Froschringerlösung gefüllte und mit Sauerstoff oder Luft durchperlte Paraffinwanne gebracht. Bei neuerwachender Spontantätigkeit wird ein stehengebliebener Rest reizbildenden Gewebes erneut entfernt. Durch das genannte Bad erholt sich der Streifen vom Eingriff der Präparation. Denn die angeschnittenen Herzmuskelelemente (K. E. Rothschuh[4]) entladen sich, so daß das Organ nachher praktisch als unverletztes Gebilde betrachtet werden kann. Ferner gibt der Streifen anfangs aus seinen zerschnittenen Fasern reichlich Kalium ab. Beide Vorgänge müssen beendet bzw. konstant geworden sein, bevor wir mit einem ganz gleichmäßigen Verhalten des Präparates rechnen können. Man sollte deshalb nicht unter eine Vorbehandlungszeit von 30 min heruntergehen. Eine längere Badezeit hat keinen Einfluß auf die Leitungsgeschwindigkeit.

2. Apparatur und Anordnung.

Nach Beendigung dieser Vorbehandlung wird das Präparat in eine Kammer aus Plexiglas oder Paraffin gebracht, und zwar so, daß der Streifen durch seitliche Einschnitte der Kammerwand hindurchgeführt wird (Abb. 1). An diesen Stellen wird die Kammer durch Ramsayfett oder ein anderes unschädliches Fett gedichtet. Die Kammerlichtung soll nicht unter 25 mm lang sein. Ihr Voluminhalt kann durch Ausgießen mit Paraffin auf jede Größe zwischen 1 und 3 cm^3 gebracht werden. Ein kleiner Rauminhalt ist u. U. bedeutungsvoll bei geringen Mengen einer Testlösung. Durch kleine Bohrungen in dem Paraffinausguß der Kammer *kann* Luft in feinen Perlen zugeführt werden. Auf die Streifenenden legen wir je ein Elektrodenpaar an, am besten Zink-Zinksulfat-Wollfadenelektroden, deren Fäden sowohl drucklos anliegen als auch durch ihr Mitgehen bei Bewegungen eine unveränderte Lage der Abgriffspunkte garantieren. Man mißt die Leitungsgeschwindigkeit durch Registrierung der Aktionsströme vor dem Eintritt und nach dem Austritt der Erregung mit 2 getrennten Verstärker- und Registriersystemen, z. B. mit dem Atlas-Doppelelektrokardiographen EM 29 Spezial und 2 Elektrodenpaaren (Abb. 1 B) und erhält dabei 2 getrennte diphasische Elektrogramme. Der Abstand der Spitzen von *R* wird der Zeitmessung zugrundegelegt. Man kann auch einen einfachen Verstärkerelektrokardiographen benutzen und je eine Elektrode außerhalb der Kammer dem Anfang bzw. dem Ende des Streifens anlegen (Abb. 1A). Auch dann erhält man 2 getrennte Elektrogramme, deren *R*-Spitzenabstände man der Zeitmessung zugrundelegt. Warum hier 2 Elektrogramme entstehen, kann andernorts (K. E. Rothschuh[5]) nachgelesen werden. Die Erregungswelle, deren Zeitbedarf für den Durchgang unter den Elektroden gemessen werden soll, wird an einem Streifenende außerhalb der Kammer und außerhalb der Meßstrecke durch einen elektrischen Reiz ausgelöst.

Diese Anordnung hat eine für gewisse Fragestellungen nachteilige Eigenart. Man mißt hiermit die Leitungsgeschwindigkeit in einer Strecke, die nur in ihrem mittleren Anteil der Prüflösung ausgesetzt werden kann. Einige Millimeter des Präparates bleiben von ihr unbeeinflußt, wie aus der Abb. 1 hervorgeht. Wir entwickelten daher die folgende Modifikation unserer Anordnung. Der Streifen wird mittels seiner Fäden und Stecknadeln auf 2 Korkbänkchen horizontal ausgespannt befestigt. Dann wird er auf die Elektroden gelegt, die von unten an ihn heran-

geführt werden, und zwar auf ein Paar Platinreizelektroden und 2 Paar Silberdrahtableitungselektroden mit geringem Eigenwiderstand. Endlich wird von unten her die Paraffinwanne mit der Lösung durch ein Stativ mit Zahn und Trieb ge-



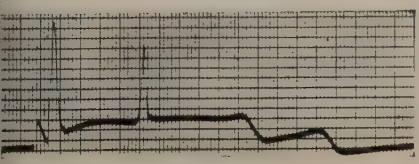


Abb. 1A.

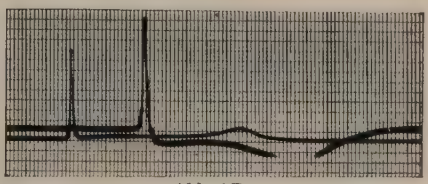


Abb. 1B.

Abb. 1A. Vereinfachter Abgriff mit *einem* Registriersystem und einem Elektrodenpaar. Jeweils eine Elektrode liegt vor bzw. hinter der Kammer dem Streifen an. Der Flüssigkeitsinhalt der Kammer wirkt als verlängerte Abgriffselektrode. Die Spitze der ersten *R*-Zacke gibt den Zeitpunkt an, in welchem die Erregung bei 2 in die Kammer eintritt. Der Anstiegsfußpunkt der zweiten *R*-Zacke entspricht dem Zeitpunkt, in welchem die Erregung bei 3 die Kammer verläßt. Die Spitze von R_2 gibt das Eintreffen der Erregung unter der zweiten Elektrode bei 4 an. Die Leitungsgeschwindigkeit errechnet sich aus der Länge der Abgriffsstrecke zwischen 2 und 4 und dem Zeitbedarf für das Durchwandern dieser Strecke, der aus der Zeitversetzung der Spitzen von R_1 und R_2 entnommen wird. Unter der Zeichnung befindet sich ein Kurvenoriginal dazu.

Abb. 1B. Abgriff mit *zwei* unabhängigen Registriersystemen und zwei Elektrodenpaaren. Die Leitungsgeschwindigkeit errechnet sich aus der Zeitversetzung von R_1 und R_2 und der Länge der Abgriffsstrecke zwischen der zweiten und vierten Elektrode. Unter der Zeichnung befindet sich wiederum eine Originalkurve.

hoben, so daß der *gesamte* Streifen einschließlich der Reiz- und Ableitungselektroden vollständig in das Bad eintaucht. Bei genügender Menge von Testlösung ist diese Methode vorteilhaft. Zur Messung der Leitungsgeschwindigkeit wird das Präparat stets kurzfristig aus der Wanne herausgehoben, indem diese nach unten gesenkt wird. Wir verwendeten zur Reizung mit Einzelreizen oder längerdauernden

Reizserien den automatisch arbeitenden Stimulator der Elektromedizinischen Werkstätten Hamburg. Hierbei muß der Pluspol der Platinreizelektroden an Erde gelegt werden.

3. Bedingungen für ein konstantes Verhalten des Präparates.

Durch das Einlegen in die Kammer erfährt der Streifen 2 *Alterationen*. Erstens wird er leicht gedehnt, aber dieser Vorgang kann vernachlässigt werden (F. Schellong[6]). Zweitens wird er an der Stelle des Durchgangs durch die Kammereinschnitte und durch die Dichtung mit Fett bei der Einbettung örtlich leicht gedrückt. Das führt zur lokalen Herabsetzung der Leitungsgeschwindigkeit und u. U. bei mangelnder Vorsicht zum vorübergehenden örtlichen Leitungsblock. Alle diese Alterationen durch die Einbettung sind völlig reversibel. 30 min genügen dazu.

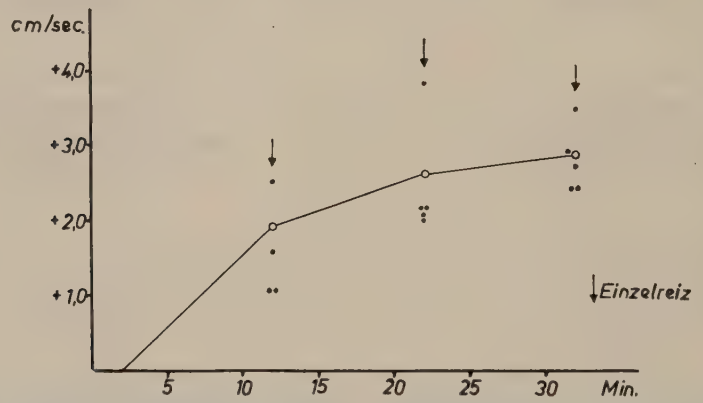


Abb. 2. Darstellung der Zunahme der Leitungsgeschwindigkeit in Zentimeter/Sekunden gegenüber dem Anfangswert, gemessen durch Einzelreize (Pfeile) im Abstand von je 10 min. Ordinate: Zunahme der Leitungsgeschwindigkeit in Zentimeter/Sekunden. Abszisse: Zeit in Minuten vom Zeitpunkt der Einbettung an. Punkte = Einzelwerte. Kreise = Näherungswerte. Die ausgezogene Kurve ist die Mittelwertskurve.

Die Abb. 2 zeigt das Verhalten des Streifens während dieser Zeit an einigen Beispielen. Die Kurve verdeutlicht den Zuwachs an Leitungsgeschwindigkeit bis zu ihrer allmählichen Konsolidierung im Verlaufe von etwa 30 min. Geprüft wurde mit Einzelreizen zu den angegebenen Zeitpunkten. Zwischen der 30. und 60. min gibt es nurmehr eine geringe Zunahme der Leitungsgeschwindigkeit. Der Näherungswert der Leitungsgeschwindigkeit aus 40 Einzelwerten, gewonnen etwa 35 min nach dem Einbetten in die Kammer, beträgt 11,34 cm/sec. 30 min später liegt der Näherungswert aus 30 Versuchen bei 12 cm/sec. Die Näherungswerte zeigen also bei ca. 18° C zwischen der 35. und 65. min nach dem Einbetten noch eine Zunahme um rund 0,6 cm/sec. In den folgenden 2 Std, die zur Auswertung von Prüfsubstanzen geeignet sind, bleibt die Leitungsgeschwindigkeit praktisch konstant. Mitunter zeigt sie nach Ablauf 1 Std eine geringe Neigung zur Abnahme. Mit einer Konstanz kann man unter folgenden Bedingungen rechnen: 1. Anwendung von Einzelreizen im Abstand von 1—5 min, 2. vorsichtiges Vorgehen beim Einbetten, 3. Verwendung frischer Ringer-Lösung in der Kammer, dazu Luftzufuhr.

Bemerkenswert und eigenartig ist das Verhalten des Organs, wenn an Stelle von Einzelreizen in einem größeren Zeitabstand eine *Dauerreizung* mit einer Reizfrequenz von 30/min verwendet wird. Dabei kommt

es zu einer Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit gegenüber dem Ausgangswert um 1—2 cm/sec. Nach etwa 30 min wird ein konstanter Wert erreicht, der dann für längere Zeit aufrecht erhalten wird (Abb. 3). Der Befund ist überraschend. Denn man sollte auf Grund der Beobachtungen von F. SCHELLONG und E. SCHÜTZ[7] erwarten, daß mit einer Belastung von

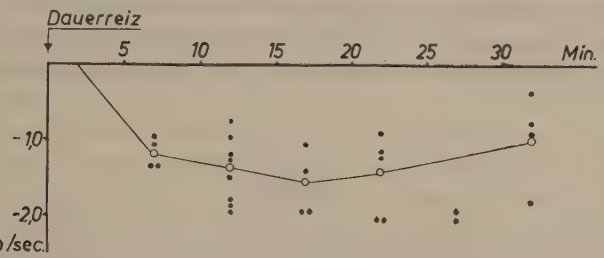


Abb. 3. Darstellung der Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit gegenüber dem Anfangswert, welche bei Verwendung von Dauerreizen einer Frequenz von 30/min regelmäßig beobachtet wird. Ordinate: Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit in Zentimeter/Sekunden. Abszisse: Zeit in Minuten vom Beginn der Einbettung an. Punkte = Einzelwerte. Kreise = Näherungswerte. Mittelwertskurve des Zeitverlaufs der Leitungsgeschwindigkeit ausgezogen.

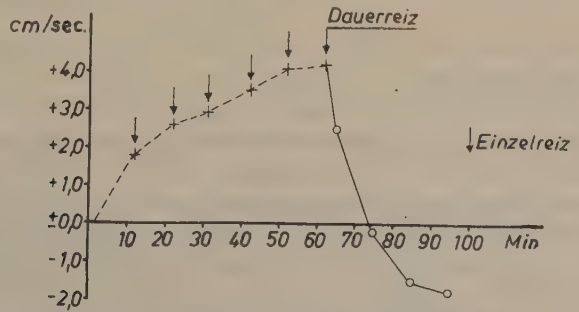


Abb. 4. Anfängliche Zunahme der Leitungsgeschwindigkeit in einem ruhenden Streifen. Prüfung der Leitungsgeschwindigkeit mit Einzelreizen von 10 min Abstand (Pfeile). Mit dem Beginn einer Dauerreizfolge von 30/min sinkt die Leitungsgeschwindigkeit stark ab. Die Werte auf der Abszisse bedeuten Minuten, auf der Ordinate Zunahme bzw. Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit gegenüber dem Anfangswert.

nur je einem Reiz in 2 sec ein Einfluß der Refraktärphase der vorangehenden Erregung auf die Leitung der folgenden ausbleiben würde. Doch scheint das hier anders zu sein. Dieses Verhalten des Streifens wird besonders schön durch den Versuch der Abb. 4 belegt: unter Einzelreizen in größerem Abstand steigt die Geschwindigkeit der Erregungsleitung während der Versuchszeit allmählich an. Von dem Moment aber, von dem an der Streifen durch eine Reizserie mit der Frequenz von 30/min belastet wird, sinkt die Leitungsgeschwindigkeit schnell auf einen tieferen Wert, der dann allerdings über längere Zeit konstant bleibt. Beschickt man also den Streifen sogleich nach der Einbettung in die Kammer mit einer Impulsfolge von 30/min, so kann man das

Präparat nach einer ½ Std als konstant ansehen und Testlösungen zur Anwendung bringen. Man halte die *Impulsfrequenz konstant*, um nicht Schwankungen der Leitungsgeschwindigkeit hervorzurufen. Spontantätige Streifen, wie man sie nach der andernorts angegebenen Methode (K. E. Rothschuh[8]) herstellen kann, sind wegen ihrer Schwankungen der Frequenz nicht geeignet. Bei einer Verminderung der Reizfrequenz sinkt die Leitungsgeschwindigkeit unter den Ausgangswert, bei einer Zunahme der Reizfrequenz steigt auch die Leitungsgeschwindigkeit an.

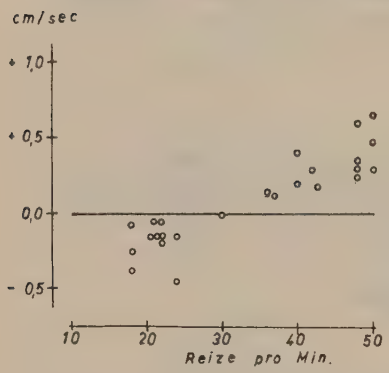


Abb. 5.

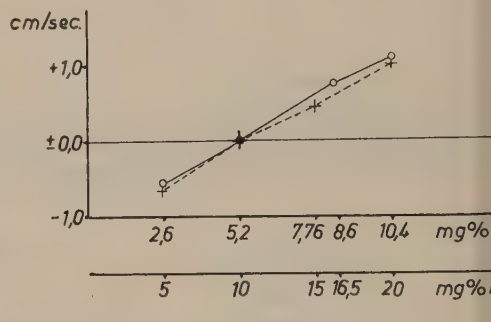


Abb. 6.

Abb. 5. Zu- bzw. Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Reizfrequenz. Mit wachsender Reizfrequenz steigt die Geschwindigkeit der Erregungsleitung bis zu einer Frequenz von 50/min an.

Abb. 6. Zu- bzw. Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit bei Veränderung der K-Konzentration in der Prüflösung gemessen in Zentimeter/Sekunden gegenüber dem Ausgangswert (bei 10 mg% KCl) im Bereich von 5—20 mg% KCl. Alle Werte wurden 2 min nach der Änderung der K-Konzentration erhoben. Man findet gleichartige Ergebnisse sowohl bei Verwendung von Einzelreizen am sonst ruhenden Streifen wie bei Dauerreizfolgen. Kreuze = Näherungswerte bei Einzelreizmessung. Kreise = Näherungswerte bei Dauerimpulsfolge von 30 min. Unterbrochene Kurve = Mittelwertskurve bei Einzelreizen. Ausgezogene Kurve = Mittelwertskurve bei Dauerreizfolge.

Das zeigt die Abb. 5, wobei die Messung der Leitungsgeschwindigkeit jeweils 1 min nach Änderung der Reizfrequenz gemessen wurde. Dieser Befund ist theoretisch und praktisch wichtig, denn er beweist das Bestehen einer vom Nervensystem unabhängigen Fähigkeit des Herzmuskels zur Anpassung der Leitungsgeschwindigkeit an verschiedene Belastungsfrequenzen. Wir wollen hier nicht näher darauf eingehen, sondern nur die Notwendigkeit betonen, daß eine konstante Reizfrequenz verwendet wird. Daß für eine *Temperaturkonstanz* gesorgt werden muß, ist angesichts der wohlbekannten Abhängigkeit der Leitungsgeschwindigkeit von der Temperatur selbstverständlich (W. Lutz[9]).

Schließlich ist für eine Konstanz des Ionenmilieus, insbesondere für eine *Konstanz des K-Gehaltes* der Lösung Sorge zu tragen. Denn K-Vermehrung über einen Ausgangswert der Lösung von 10 mg% KCl

steigert die Geschwindigkeit der Erregungsleitung, während K-Verminderung sie herabsetzt, wie die Abb. 6 zeigt. Wir verwenden als Ausgangslösung die Frosch-RINGER-Lösung nach BARKAN, BROEMSER und HAHN[10]. Verdoppelt man oder halbiert man den K-Gehalt dieser Lösungen und ermittelt man die Leitungsgeschwindigkeit jeweils 2 min nach dem Einwirken der veränderten Lösung, so erhält man den Befund, der in der Abb. 6 wiedergegeben ist. Diese Beeinflussung der Leitungsgeschwindigkeit durch den K-Gehalt der Lösung könnte deshalb von Bedeutung sein, weil ein frisch präparierter Streifen in den ersten 2 Std fortgesetzt und in abnehmender Menge K abgibt. Wir haben die Größenordnung dieser Abgabe bestimmt und fanden nach 1 Std in der Lösung der Kammer eine maximale K-Anreicherung um etwa 0,92 mg%. Eine solche K-Vermehrung ist aber für die Leitungsgeschwindigkeit bedeutungslos. Der Befund, daß K in kleinen Konzentrationen die Leitungsgeschwindigkeit erhöht, paßt zu allen übrigen Wirkungen des K auf elektrophysiologische Vorgänge (vgl. K. E. ROTHSCHUH[1]). Es ist also methodisch wichtig, für eine völlige Konstanz des K-Gehaltes in der Lösung zu sorgen.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Messung der Leitungsgeschwindigkeit der Erregung im Froschherzstreifen beschrieben, welche das Verhalten dieser Größe gegenüber den verschiedensten physiologischen, pharmakologischen und pathologischen Einflüssen quantitativ zu verfolgen erlaubt und eine große Empfindlichkeit besitzt. Die Herstellung, die Apparatur und die Voraussetzungen für eine gute Konstanz im Verhalten des Präparates werden besprochen. Solche Voraussetzungen sind Reizfrequenz, Temperatur, Dauer der Erholung des Präparates und Zusammensetzung des Ionenmilieus, besonders hinsichtlich des K-Gehaltes.

Literatur.

[1] ROTHSCHUH, K. E.: Elektrophysiologie des Herzens. Darmstadt (1952). — [2] SCHAEFER, H., u. W. TRAUTWEIN: Pflügers Arch. **251**, 417 (1949). — [3] ROTHSCHUH, K. E.: Z. exper. Med. **110**, 154 (1942). — Arch. Kreislaufforschg **14**, 155 (1948). — [4] ROTHSCHUH, K. E.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg **16**, 226 (1950). — Pflügers Arch. **253**, 238 (1951). — [5] ROTHSCHUH, K. E.: Z. exper. Med. **110**, 175 (1942). — Pflügers Arch. **246**, 329 (1942). — [6] SCHELLONG, F.: Z. Biol. **82**, 451 (1924). — [7] SCHELLONG, F., u. E. SCHÜTZ: Z. exper. Med. **61**, 285 (1928). — SCHELLONG, F.: Z. exper. Med. **78**, 1 (1931). — SCHÜTZ, E.: Z. Biol. **87**, 219 (1928). — [8] ROTHSCHUH, K. E.: Arch. Kreislaufforschg **14**, 155 (1948) (bes. S. 161). — [9] LUTZ, W.: Z. Kreislaufforschg **37**, 270 (1948). — [10] BARKAN, G., PH. BROEMSER u. A. HAHN: Z. Biol. **74**, 1 (1922).

Dr. H. BAMMER, Würzburg, Füchsleinstr. 15, Univ.-Nervenklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 374—380 (1952).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bonn.
(Direktor: Prof. Dr. Ebbecke.)

Blutgerinnungsbeeinflussung durch Cystaminhomologe.

Von
H. Moll.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. November 1951.)

Versuche über die Beeinflussung der Gerinnungszeit durch Aminosäuren in vitro bestätigten die schon von Mueller und Sturgis sowie Rieben beschriebene hemmende Wirkung des Cysteins. Rieben konnte auch den Mechanismus der Hemmung aufdecken, indem er die Antiprothrombinwirkung des Cysteins nachwies. Das durch Oxydation von zwei Molekülen Cystein entstehende Cystin ist kaum wasserlöslich und die gelösten Spuren verändern die Gerinnungskurve nicht. Auf der Suche nach wasserlöslichen, dem Cystin verwandten Verbindungen stießen wir in Gedankenaustausch mit Herrn Dr. Weingarten vom Physiologisch-chemischen Institut Bonn auf die zum ersten Male von W. Dirscherl und F. W. Weingarten synthetisierten Cystamine, die in homologer Reihe einen steigenden gerinnungshemmenden Effekt zeigen. Cystamin ist decarboxyliertes Cystin und Dirscherl und Weingarten synthetisierten vier verschiedene Cystamine, die sich jeweils durch die Anzahl der Methylengruppen im hälftigen Molekül unterscheiden. Die Grundformel zeigt folgendes Bild:

$$H_2N \cdot (CH_2)_x \cdot S — S \cdot (CH_2)_x \cdot NH_2$$

und x kann 4, 6, 8 oder auch 10 bedeuten.

Einzelheiten über die Synthese der Verbindungen s. W. Dirscherl und F. W. Weingarten.

Methodik.

Zur Bestimmung der Blutgerinnungszeit dient die von Ebbecke und Knüchel ausgearbeitete und beschriebene elektrophotometrische Methode. Diese basiert auf der Lichtdurchlässigkeitsänderung von rekalzifiziertem Plasma während des Umwandlungsprozesses von Fibrinogen in Fibrin. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß nicht nur Anfang und Ende der Gerinnung sondern der *gesamte* Gerinnungsvorgang beobachtet werden kann.

Eine kleine methodische Abänderung wurde insofern vorgenommen, als das Mischungsverhältnis 2,0 Plasma : 2,0 Aqua dest. : 2,0 Calciumchloridlösung nicht beibehalten wurde. Unser Gerinnungssubstrat setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 Citratplasma : 2,5 Veronalpuffer nach Michaelis: 1,0 Aqua dest., in dem das gerinnungshemmende Agens gelöst war, und 2,0 Calciumchloridlösung (0,5%). Die Anregung, die Plasmamenge von 2,0 auf 0,5 cm³ zu reduzieren, geht auf einen Vorschlag von Benthaus zurück. Abb. 1 zeigt auf der Ordinate die Galvanometerwerte nach Ablauf des Gerinnungsvorganges und auf der Abscisse verschiedene Mengen Plasma, die mit Aqua dest. jeweils auf 4 cm³ und weiteren 2 cm³ $CaCl_2$-Lösung auf 6 cm³ aufgefüllt wurden. Die Kurve veranschaulicht also die Abhängigkeit der Endextinktion vom Fibrinogengehalt. Der steilere Verlauf des ersten Teils der Kurve besagt, daß in diesem Bereich das Auflösungsvermögen des Photometers für kleinere Unterschiede im Fibrin- bzw. Fibrinogengehalt größer ist.

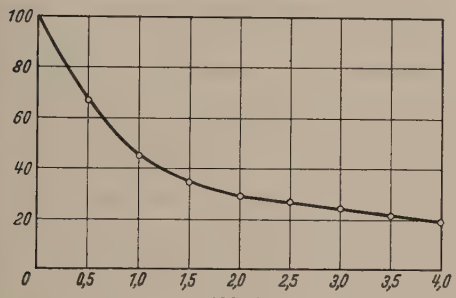


Abb. 1.

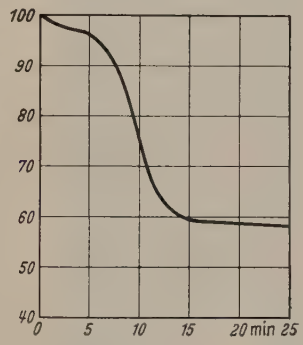


Abb. 2.

Abb. 1. Abhängigkeit der Endextinktion vom Fibrinogengehalt.
Abb. 2. 0,5 Rinderplasma + 3,5 Aqua dest. + 2,0 $CaCl_2$.

Wenn auch der Fibrinogengehalt des Plasmas, dessen photometrisch bestimmter Wert nach Knüchel und Ganter mit dem nach Howe chemisch ermittelten übereinstimmt, in unseren Versuchen nicht im Vordergrund stand, so hielten wir uns doch an die Plasmamenge von 0,5 cm³, zumal die Cystaminhomologe nur in beschränkter Menge zur Verfügung standen und sich ihr Einfluß auf die Blutgerinnung am stärker verdünnten Plasma bei der gegebenen Methode deutlicher manifestiert. Außerdem ist die Verwendung von nur 0,5 cm³ Plasma an Stelle der ursprünglich benötigten 2,0 cm³ ein weiterer Vorteil.

Ein Versuch geht nun so vor sich, daß man nach Zusatz des $CaCl_2$ eine Stoppuhr in Gang setzt, das Gerinnungssubstrat vorsichtig durchschüttelt und dann das Reagensglas mit dem transparenten Inhalt in den Behälter zwischen Lichtquelle und Photoelement stellt. Der Behälter enthält Wasser von konstant 20° C. Durch Veränderung des Widerstandes stellt man das Galvanometer auf 100 und liest jede Minute ab. Trägt man diese Werte in ein Koordinatensystem ein, bei dem auf der Abscisse die Zeit und auf der Ordinate der Galvanometerausschlag aufgetragen ist, so erhält man die bekannten S-förmigen Gerinnungskurven.

Der Gebrauch des Veronalpuffers beseitigte einen anfangs sehr störenden Fehler: Wird das Plasma durch Aqua dest. anstatt durch Pufferlösung verdünnt, so zeigt sich schon zu Beginn des Versuches ein schnelleres Absinken der Kurve (Abb. 2). Dieses Phänomen hängt nicht direkt mit dem Gerinnungsvorgang zusammen, sondern ist allein abhängig von der Verdünnung des Plasmas mit Aqua dest.; denn Versuche ohne $CaCl_2$-Zusatz zeigen ebenfalls ein anfängliches Absinken um einige Skalenteile. Wird Aqua dest. durch die Pufferlösung ersetzt, so verschwindet die Störung und man erhält einwandfreie Kurven. Messungen der Wasserstoffionenkonzentration in den beiden verschiedenen Gerinnungssubstraten lassen

daran denken, daß der p_H-Wert von 6,2—6,5 im Falle der Wasserverdünnung die Ursache einer Eiweißausfällung ist, welche die störende Anfangsextinktion bedingt. Arbeitet man durch Verwendung des Puffers im schwach alkalischen Milieu, so verschwindet der störende Fehler.

Zur Durchführung von in vivo-Versuchen diente die Prothrombinbestimmnng in zwei Phasen nach Rieben, modifiziert von Schultze. Als Versuchstiere nahmen wir Kaninchen, deren Ohrvenen zur Injektion und Punktion geeignet sind.

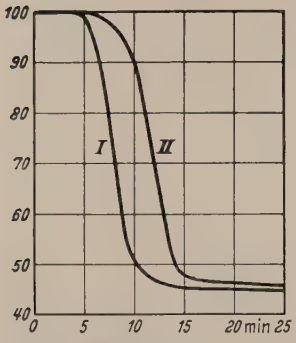


Abb. 3. I: Normalversuch. II: 0,5 Plasma + 2,5 Puffer + 1,0 Bis-(ω-amino-butyl)-disulfid (= 5 mg) + 2,0 $CaCl_2$.

Ergebnisse.

Um einen deutlichen Effekt mit Cystamin 4 [Bis-(ω-amino-butyl)-disulfid], dem niedersten Homologon, zu erzielen, bedarf es des Zusatzes von 5 mg des Stoffes, der wie in allen folgenden Versuchen in 1 cm^3 Wasser gelöst ist. Aus Abb. 3 geht hervor, daß die hemmende Wirkung des Cystamins mit 4 Methylengruppen im hälftigen Molekül zwar geringer ist als die des Cysteins, aber die Wirkung des Cystamin 6 [Bis-(ω-amino-n-hexyl)-disulfid] wird schon bei Zusatz von 2,5 mg zum Gerinnungssubstrat deutlich (Abb. 4). Die Hälfte dieser Menge — 1,25 mg —

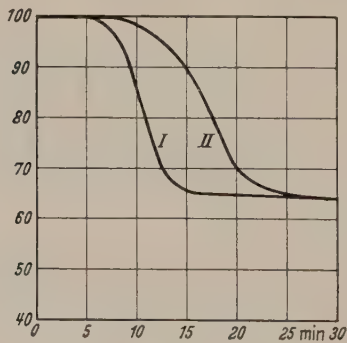


Abb. 4.

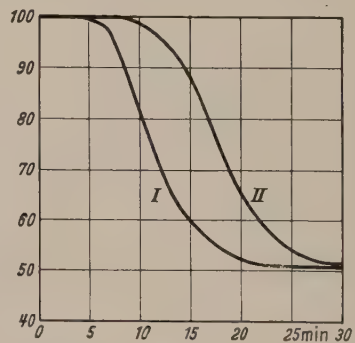


Abb. 5.

Abb. 4. I: Normalversuch. II: 0,5 Plasma + 2,5 Puffer + 1,0 Bis- (ω-amino-n-hexyl)-disulfid (= 2,5 mg) + 2,0 $CaCl_2$.

Abb. 5. I: Normalversuch. II: 0,5 Plasma + 2,5 Puffer + 1,0 Bis- (ω-amino-n-octyl)-disulfid (= 75 γ) + 2,0 $CaCl_2$.

verändert die Normalkurve nicht mehr. Als Beispiel für den stärkeren Einfluß des nächst höheren Gliedes der synthetisierten Reihe sei Abb. 5 angeführt: 75 γ bereits verzögern den Gerinnungsbeginn ums Doppelte des Normalwertes und lassen den Gesamtvorgang viel träger verlaufen. Durch Zugabe von 1,25 mg des hemmenden Agens entsteht ein weißgelber Niederschlag, der sich aber durch die Zugabe von Pufferlösung

und $CaCl_2$ und die dadurch bedingte höhere Verdünnung fast völlig auflöst. Diese Menge von 1,25 mg bewirkt das Bild der unvollkommenen Gerinnung, wie sie Abb. 6 zeigt. Es bildet sich ein feines, lockeres, weitmaschiges Fibrinnetz, das beobachtet wird im Liquor cerebrospinalis bei tuberkulöser Meningitis und experimentell, wie Ebbecke zeigt, durch starkes Verdünnen, besonders unter leichtem KCl-Zusatz erreicht werden kann (Spinnwebgerinnsel). Das lückenhafte Fibringel erreicht noch nicht nach Stunden annähernd die Endextinktion des Normalversuches. Die unvollkommene Gerinnung läßt sich durch jedes der vier Cystaminhomologe hervorrufen, nur muß man von den niederen Homologen mehr, von den höheren weniger an Substanz zusetzen.

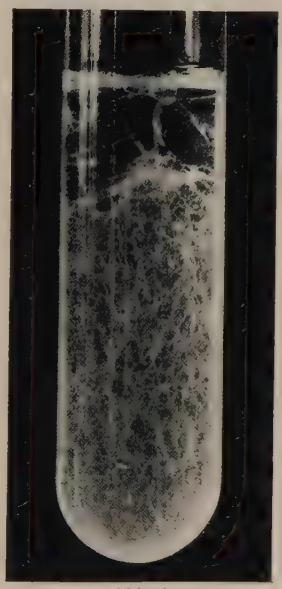


Abb. 6.

Die höchstmolekulare Verbindung, das Cystamin 10 [Bis-(ω-amino-n-decyl)-disulfid] schließlich, weist mit einem Zusatz von 25 γ, der noch deutlich verzögernden Einfluß erkennen läßt (Abb. 7), die stärkste Wirkung auf. 10 γ lassen keinerlei Effekt mehr erkennen. An die Wirkungsstärke des durch die Antikoagulanstherapie in den Vordergrund getretenen Heparins reicht das Cystamin 10 aller-

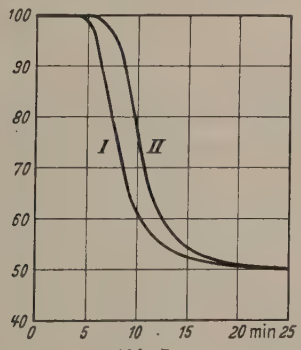


Abb. 7.

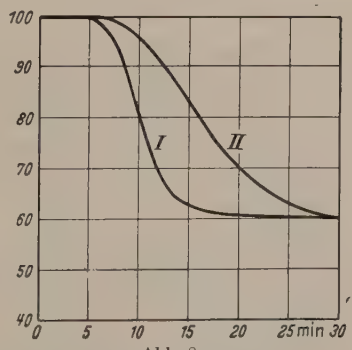


Abb. 8.

Abb. 7. I: Normalversuch. II: Veränderung der Normalkurve durch Zusatz von 25 γ des Bis-(ω-amino-n-decyl)-disulfid.

Abb. 8. I: Normalkurve. II: 0,5 Plasma + 2,5 Puffer + 1,0 Vetren (= 0,78 γ) + 2,0 $CaCl_2$.

dings bei weitem noch nicht heran: Wie Abb. 8 zeigt, bewirken 0,78 γ Vetren einen größeren Erfolg als 25 γ des Cystamin 10.

Zur Feststellung des Angriffspunktes des Stoffes — ob in der 1. oder 2. Gerinnungsphase — empfiehlt sich die Zweiphasenmethode der Prothrombinbestimmung nach Rieben und Schultze. Zusatz von 2 mg Cystamin in der Aktivierungsphase ergibt eine starke Verlängerung der Gerinnungszeit im Fibrinogenröhrchen; umgekehrt verursacht vorherige Cystaminbeigabe zum Fibrinogen keine Verlängerung der Gerinnungszeit, wenn das entstehende Thrombin überführt wird. Ist Thrombin gebildet, so übt Cystamin keine hemmende Wirkung mehr aus, es hemmt vielmehr die Thrombinbildung und greift somit in der 1. Gerinnungsphase an.

Die nur in geringer Menge zur Verfügung stehenden Cystaminhomologa erlaubten nur eine beschränkte Anzahl von *in vivo-Versuchen*

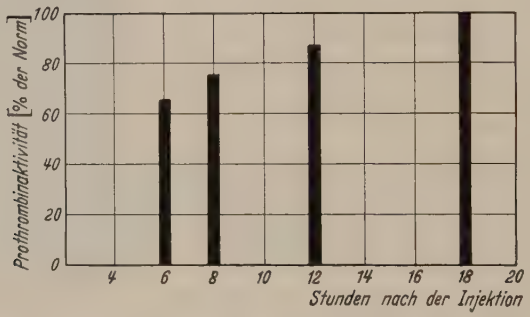


Abb. 9. Beeinflussung der Prothrombinaktivität eines Kaninchens (Gew. 2,4 kg) durch 30 mg Cystamin 8 Bis-(ω-amino-n-octyl)-disulfid intravenös.

(mit Cystamin 4 und 8). Während der biologischen Untersuchungen wurden die Kaninchen schon 1 Tag vor Versuchsbeginn ohne Nahrungsaufnahme gehalten. Nach der Blutentnahme zur Feststellung des Durchschnittswertes der Prothrombinzeit und Gerinnungszeit injizierten wir einem Kaninchen 80 mg Cystamin 4 [Bis-(ω-amino-butyl)-disulfid]. Das Tier reagierte in keiner Weise absonderlich, zeigte aber auch keinerlei Beeinflussung der Prothrombin- und Gerinnungszeit. Abb. 9 zeigt die Prothrombinzeit verlängernde Wirkung einer einmaligen intravenösen Gabe von 30 mg Cystamin 8 [Bis-(ω-amino-n-octyl)-disulfid], die vom Tier ebenfalls gut vertragen wird. Bei einer Erhöhung der Dosis auf 100 mg tritt nun aber der äußerst toxische Charakter der Verbindung zutage: Noch während der Injektion, die das Kaninchen zunächst ruhig hinnimmt, wird das Tier stark unruhig, es kommt zu Krämpfen, Tachypnoe und finaler Schnappatmung. Der Tod tritt innerhalb von 20—30 sec ein. Bisweilen tritt blutiger Schaum aus dem Mund. Man hat den Eindruck eines akuten Erstickungstodes.

Die Sektion eines derart vergifteten Tieres, durchgeführt von Herrn Dr. Oebike vom Bonner Pathologischen Institut, ergibt als charakteristischen makrosko-

pischen Befund: stecknadelkopfgroße, subpleurale, dichtstehende Petechien über allen Lungenlappen; diese Petechien ordnen sich vornehmlich in gleichmäßigen Streifen entlang der Intercostalräume an. Mikroskopisch sieht man in den Schnittpräparaten der einzelnen Lungengeschosse subpleurale Blutansammlungen in kleineren Alveolargruppen. Bei erheblicher Hyperämie des pleuralen und pulmonalen Capillarnetzes zeigt sich ein vorwiegend zellarmes Ödem und geringer Luftgehalt des Lungengewebes. Nur an einzelnen Stellen häufen sich corpusculäre Elemente in den Alveolen an. Die Lungenarterien zeigen auffallenderweise eine nur mangelhafte Lichtung bei dicker Wandung und zentral dicht stehenden Endothelien. Von den übrigen Körperorganen wurden die Nieren, Nebennieren, Leber, Milz, sowie Stirn- und Kleinhirn histologisch untersucht. Abgesehen von einer fleckigen und stellenweise sehr erheblichen Hyperämie und ganz vereinzelten kleinen Blutungen in die Hirnsubstanz konnten keine pathologischen Befunde erhoben werden.

Über die Deutung dieses akuten Vergiftungsbildes läßt sich Endgültiges noch nicht sagen. Die Capillarwirkung erinnert an die des Histamins. Ein Tierversuch am Kaninchen, das durch intravenöse Gabe von 5 mg Histamin getötet wurde, zeigte ähnliche Lungenbefunde wie die oben beschriebenen. Bei einer Stromstärke von 2 mA Gleichstrom (Dauer 2 min, Reizflächendurchmesser 2 cm) wurde Cystamin 8 (1 : 400) in die Volarseite des Unterarms elektrophoretisch unter der Anode eingedrückt. Es entstand eine Hautquaddel, die der durch Histamin erzeugten Quaddel gleicht.

Schwere Blutungen in den Lungen und Ödem sahen auch Fritz und Jansen bei akuter Vergiftung mit hohen Dosen Dicumarol. Richter beschreibt das Vergiftungsbild von Wanderratten durch α-Naphthylthioharnstoff („Antu"), das sich in einer erhöhten Durchlässigkeit der Lungencapillaren und Lungenödem mit Erstickungstod äußert. Einen weiteren Hinweis für die Toxizität des Bis-(ω-amino-n-octyl)-disulfid ergibt eine paravenöse Injektion der marginalen Ohrvene des Kaninchens: Nach wenigen Stunden bildet sich ein starkes Ödem dieses Ohres aus und im Verlauf mehrerer Tage verfällt der laterale Ohrrand der Nekrose mit anschließender Demarkation.

Wenn auch die in vivo-Versuche durch den vorläufigen Mangel an Substanz noch nicht ganz abgeschlossen werden konnten, so läßt sich doch sagen, daß die Wirksamkeit und Toxizität der Cystaminhomologe mit steigendem Molekulargewicht zunimmt. Ein ähnliches Verhalten beschreiben Husemann, von Kaulla und Kapesser bei Gerinnungsversuchen mit Schwefelsäureestern polymerhomologer Reihen von Cellulose und Polyvinylalkoholen: Bei diesen unverzweigten Produkten nimmt die Toxizität mit steigendem Molekulargewicht ganz erheblich zu, die Wirksamkeit in geringem Maße ab.

Zusammenfassung.

Die von W. Dirscherl und F. W. Weingarten zum erstenmal synthetisierten Cystaminhomologa werden in ihrer Wirkung auf die Blutgerinnung in vitro und in vivo untersucht. Die Substanzen wirken in vitro deutlich gerinnungshemmend. Dieser Effekt nimmt mit steigendem Molekulargewicht zu. Cystamin 6 [Bis-(ω-amino-n-hexyl)-disulfid]

ist in seiner hemmenden Wirkung dem Cystein gleichzusetzen, während Cystamin 8 [Bis-(*o*-amino-n-octyl)-disulfid] etwa 30mal stärker wirkt und die Verbindung mit 10 Methylengruppen im hälftigen Molekül wiederum doppelt so stark wie Cystamin 8. Im Kaninchenversuch werden 30 mg des Cystamin 8 gut vertragen und diese Menge bewirkt nach 6 Std eine Prothrombinaktivität von 63%. Nach 18 Std ist die Prothrombinaktivität wieder normal (100%). 100 mg dieser Substanz töten ein Kaninchen in 10—20 sec; es kommt zu schweren Schädigungen der Lungencapillaren, Lungenödem und Erstickungstod.

Literatur.

Benthaus, J.: Unveröffentlichte Mitteilung. — Dirscherl, W., u. F. W. Weingarten: Ann. d. Chem. (im Druck). — Ebbecke, U.: Kolloid-Z. **91** (1940). — Ebbecke, U., u. F. Knüchel: Pflügers Arch. **243**, 54, 65 (1940). — Fritz: Magy. orv. Arch. **1943**, 5. — Howe: J. of Biol. Chem. **49**, 93, 109 (1921). — Husemann, v. Kaulla u. Kapesser: Z. Naturforschg **1**, 584 (1946). — Jansen: Ohne Literaturangabe zit. in Schmid: Die Blutgerinnung. S. 178. Wien: Verl. Maudrich 1951. — Knüchel u. Ganter: Klin. Wschr. **35/36**, 557 (1948). — Michaelis: Biochem. Z. **234**, 139 (1931). — Müller, J. H., and S. Sturgis: Science (Lancaster, Pa.) **1932**, 140. — Richter, C.: J. Amer. Med. Assoc. **129**, 927. — Ref. v. Hüter: Z. Naturforschg **1**, 418 (1946). — Rieben, W. K.: Beitr. z. Kenntnis d. Blutgerinnung. Basel: Benno Schwabe u. Co. Verlag 1947. — Schultze, H. E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 173 (1949).

Dr. Heinz Moll, Bonn, Physiologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 381—391 (1952).

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. E. Lehnartz).

Die Beziehungen zwischen Schilddrüse und Muskelatrophie*.

Von
Carl Gottfried Schmidt, Marianne Bogatzki und Lena Fischer.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 12. Oktober 1951.)

Neben der Beeinflussung der körperlichen und geistigen Entwicklung sowie des allgemeinen Stoffwechsels durch das Inkret der Schilddrüse sind zahlreiche biologische Einzelvorgänge bekannt geworden, die ebenfalls dem Einfluß der Schilddrüse unterliegen. So konnten Gaarenstroom[1] und Kleinsorg und Loeser[2] eine stimulierende Wirkung getrockneten Schilddrüsengewebes bzw. des Thyroxin auf die kompensatorische Hypertrophie der Niere nach einseitiger Nephrektomie feststellen, die nach Entfernung der Schilddrüse durch Hypophysenvorderlappenextrakte nur schwach zu erzeugen war (Selye[3]). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Entwicklung mäßiger Splanchnomegalie[3] und der Zunahme des Nebennierengewichtes[4–12] bei leichter Hyperthyreose. Auch die Spermatogenese und die Tätigkeit der Leydigschen Zwischenzellen[13] sowie das Wachstum von Gewebekulturen[14] werden durch Thyroxin angeregt.

Nicht nur der Vorgang der Hypertrophie, sondern auch die Ausbildung atrophischer Zustände ist abhängig von der Tätigkeit der Schilddrüse. So weisen klinische Beobachtungen erheblicher Muskelschwäche bzw. Zustände akuter Muskeldystrophie bei schwerem Hyperthyreoidismus — ihre Besserung nach Jodbehandlung oder subtotaler Thyreoidektomie — auf Beziehungen zwischen Muskelatrophie, Schilddrüse und Jodstoffwechsel hin[3, 15–19].

Askanazy[20] fand bei Hyperthyreosen Atrophie und sogenannte degenerative Veränderungen der Zellen und Zellkerne im quergestreiften Muskel. Thioharnstoff und KJ hemmen die Ausbildung der Muskelatrophie, während sie durch Thyroxin — infolge Erleichterung der Abbauvorgänge[3] — beschleunigt wird[21, 22]. Nach Fütterung mit Schilddrüsengewebe setzt ferner das Muskelfibrillieren während Denervierungsatrophie früher ein[23].

Die Beeinträchtigung der Muskelfunktion als Folge gesteigerter Schilddrüsentätigkeit ist eng verbunden mit der Beeinflussung des Kreatinstoffwechsels[24–31], wobei im Zustande der Unterfunktion Kreatin nur in kleinen Mengen oder gar nicht

* Herrn Prof. Dr. Dr. A. Loeser in Verehrung und Dankbarkeit zum 50. Geburtstag gewidmet.

ausgeschieden wird, während erhebliche Kreatinurie zu den Erscheinungen der Thyreotoxikose gehört[14]. Entsprechend geht diese Kreatinurie unter Jod- oder Thiouracilbehandlung[32, 33] zurück. Die Störung des Kreatinstoffwechsels ist eine der Ursachen der Muskelschwäche bei Hyperthyreosen und als solche Ausdruck einer Fermentstörung im Skeletmuskel. So wird die Kreatinphosphokinase durch Thyroxin in vitro und in vivo stark gehemmt[34], so daß im hyperthyreotischen Zustand nicht genügend Phosphokreatin durch Dephosphorylierung von ATP[35], andererseits zu wenig Kreatin aus der Dephosphorylierung von Phosphokreatin und Phosphorylierung von ADP zu ATP gebildet werden kann. Die Störung im ATP-Phosphokreatin-Cyclus infolge Beeinträchtigung der energiereichen Phosphatverbindungen muß neben der Erleichterung der Abbauvorgänge durch Thyroxin[3] zu den besonderen Merkmalen der Muskelatrophie infolge Überfunktion der Schilddrüse gerechnet werden.

Der Untersuchung der Schilddrüseneinwirkung auf biologische Einzelvorgänge sind bisher nur wenige Ergebnisse über die umgekehrte Einwirkung dieser Vorgänge auf die Schilddrüse selbst gefolgt. Zwar sind innerhalb des inkretorischen Systems die gegenseitigen Beziehungen, z. B. die Sensibilisierung des Ovars durch die Schilddrüse (Grumbrecht und Loeser[36–39]) sowie die umgekehrte periodische Veränderung der Schilddrüse in Abhängigkeit vom Cyclus des Ovarium (Grumbrecht und Loeser[40, 41]) untersucht worden; dagegen gibt es nur vereinzelte Angaben über die Einwirkung der Muskelatrophie auf das Schilddrüsengewicht[21].

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Rückwirkung einer durch Denervierung hervorgerufenen Muskelatrophie auf die Schilddrüse. Es wurden bestimmt: Schilddrüsengewicht, Histologie (Schilddrüse, Skeletmuskel), Glykogen-, Chlor- und Wassergehalt der Leber.

Methodik.

Als Versuchstiere dienten 60 ausgewachsene männliche Albinoratten eines einheitlichen Tierstammes, die sich in Gruppen zu je 10 Tieren in geräumigen Käfigen (70 × 60 × 50 cm) befanden, so daß sie frei herumlaufen konnten. 50 Versuchstiere (Mittelgewicht 235 g) wurden in Äthernarkose operiert. Der linke N. ischiadicus wurde nach seinem Austritt aus dem Foramen infrapiriforme unter Durchtrennung der Glutaealmuskulatur von dorsal durch Exhairese entfernt. Die Operationswunde wurde schichtweise genäht. Die Tiere blieben 2 Tage nach der Operation in Einzelkäfigen, anschließend wurden sie in die alten Käfige zurückgeführt. Als Kontrollen (10 Tiere, Mittelgewicht 238 g) dienten Tiere des gleichen Stammes. Das Futter der Tiere bestand aus mit Milch durchsetzter Mischnahrung und Grünfutter. Wasser stand den Tieren in Trinkgefäßen frei zur Verfügung. Die Versuche erstreckten sich über den Zeitraum April—September 1951. Alle Tiere befanden sich unter gleichen Raum-, Nahrungs- und Temperaturbedingungen.

Die Untersuchung der Tiere begann 40 Tage nach der Operation (Tötung durch Entbluten). 4—5 Std vorher wurden die Tiere von jeglicher Nahrungszufuhr abgesetzt. Die Schilddrüsen wurden auf einer analytischen Waage gewogen und anschließend in 4%igem, neutralen Formalin fixiert; Paraffineinbettung, Schnittdicke 5 μ, Färbung: Hämalaun-Eosin. Glykogenbestimmung in der Leber nach Good, Kramer und Somogyi[42]; Chloridbestimmung nach Lang[43] — die Werte sind

auf Trockensubstanz bezogen. Der Wassergehalt von Leber und Skeletmuskel wurde in der üblichen Weise bestimmt. Das Schilddrüsengewicht ist in mg/100 g Tier, das Leberglykogen in %/100 g Tier angegeben. Teile der rechten Oberschenkelmuskulatur wurden ebenfalls histologisch untersucht; Fixierung, Einbettung und Färbung wie oben.

Um eine größere Sicherheit in der Beurteilung des Schilddrüsengewichtes zu erzielen, wurde dieses bei 20 Kontrolltieren (Mittelgewicht 256 g) bestimmt. Die Tiere wurden, um die Unsicherheit tagesrhythmischer Schwankungen zu vermeiden, stets zwischen 16 und 18 Uhr getötet und anschließend seziert. Die Berechnung der mittleren Abweichung:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$$ und des mittleren Fehlers:

$$\varepsilon = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n\,(n-1)}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$ erfolgte nach Burn[44]. Zur Prüfung des Unterschiedes $x' - x''$ zwischen zwei Durchschnitten bei kleinen Stichproben wurde die t-Verteilung benutzt (siehe Linder[102]). Nach Linder[102] wird die Streuung s_d^2 nach der Formel

$$s_d^2 = \frac{1}{N_1 + N_2 - 2}\left(\sum_{i=1}^{N_1}(x_i' - \bar{x}')^2 + \sum_{i=1}^{N_2}(x_i'' - \bar{x}'')^2\right)$$ berechnet,

worauf t bestimmt werden kann: $t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s_d}\sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$.

Ergebnisse.

Im Allgemeinverhalten der Tiere bestand kein Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchstieren. Allgemeine Aktivität, Nahrungsaufnahme und Angriffslust blieben unverändert. Schon einige Tage nach der Operation hatten die Tiere ihre frühere Beweglichkeit wiedergewonnen. Es entwickelte sich schnell eine hochgradige Atrophie des linken Ober- und Unterschenkels. Die Atrophie des Oberschenkels betraf entsprechend der Versorgung des N. ischiadicus sämtliche Beugemuskeln. Nach etwa 3 Wochen war ein ziemlich stationäres Verhalten eingetreten, so daß bei Versuchsende die atrophische Muskulatur etwa $^1/_3$ der entsprechenden Muskulatur der anderen Seite betrug. Nennenswerte Unterschiede im Körpergewicht traten nicht auf.

Das Schilddrüsengewicht der Kontrolltiere betrug 14,5 mg/100 g Tier. Dagegen ließ das Gewicht der Drüsen bei den Versuchstieren mit 11,4 mg/100 g Tier einen deutlichen Abfall erkennen (Tab. 1). Die Verringerung des Schilddrüsengewichtes kann als statistisch signifikant angesehen werden. Der Wert $t = 5{,}2$ liegt weit außerhalb der „Sicherheitsschwelle" — $P < 0{,}001$ —, so daß in nur weniger als einem von tausend Fällen eine zufällige Abweichung fälschlicherweise als gesichert

behandelt werden kann. Die durchschnittliche Gewichtsabnahme der Schilddrüsen nach Muskelatrophie beträgt 21,4%.

Tabelle 1.

Tier-Nr.	Gewicht g	Schilddrüsengewicht mg/100 g Tier	Tier-Nr.	Gewicht g	Schilddrüsengewicht mg/100 g Tier	Tier-Nr.	Gewicht g	Schilddrüsengewicht mg/100 g Tier
1	235	16,5	26	239	10,9			
2	272	10,9	27	228	10,7			
3	343	11,2	28	216	10,9			
4	293	17,7	29	244	11,9	Kontrollen		
5	217	14,1	30	233	12,3			
6	230	13,1	31	223	10,8	1	207	12,8
7	186	11,8	32	211	11,8	2	254	13,4
8	227	9,0	33	209	11,3	3	317	14,9
9	211	11,3	34	279	12,0	4	242	12,5
10	232	9,4	35	261	12,5	5	243	14,9
11	230	10,5	36	252	13,7	6	225	13,7
12	246	8,1	37	206	8,3	7	246	15,3
13	237	8,1	38	244	11,3	8	276	13,4
14	209	7,0	39	219	12,1	9	164	17,2
15	243	7,8	40	208	10,8	10	219	12,9
16	283	10,9	41	239	11,2	11	244	14,1
17	233	11,2	42	206	10,4	12	322	18,3
18	244	9,8	43	243	10,1	13	290	15,7
19	250	12,0	44	205	9,2	14	294	12,1
20	269	6,3	45	192	13,7	15	244	18,9
21	274	11,2	46	227	15,1	16	259	14,7
22	242	11,4	47	164	18,1	17	260	12,7
23	238	11,4	48	238	12,7	18	336	14,0
24	234	11,6	49	229	12,4	19	264	14,7
25	249	10,6	50	226	14,2	20	225	14,2
			W M: 1—50	235	11,4	MW: 1—20	256	14,5
					$\sigma \pm 2{,}333$	$t = 5{,}2$		$\sigma \pm 1{,}857$
					$\varepsilon \pm 0{,}329$	$P < 0{,}001$		$\varepsilon \pm 0{,}415$

Die histologische Untersuchung der Schilddrüsen zeigt wenig Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

Kontrolldrüsen: Aufbau aus kleinen bis mittelgroßen, ovalen bis runden Follikeln in wechselnder Größe und Form. Kubisches bis zylindrisches, vorwiegend einschichtiges Follikelepithel mit zahlreichen Kolloidtropfen im Cytoplasma. Mittelgroße, ziemlich einheitliche, runde bis ovale Zellkerne, die zwischen Zellmitte und Zellbasis gelegen sind. Deutlich wahrnehmbare Kernstrukturen, Nucleolus und Kernmembran. Auffallend wenig pyknotische Zellkerne. Mehrfach Absonderung ganzer Zellen oder Zellbestandteile in das Follikellumen. Stellenweise ist mehrschichtiges Epithel mit papillomatösen Zellproliferationen in das Follikellumen unter Verwischung der Follikelstruktur sichtbar. Sehr spärliches, inhomogenes, mit Vakuolen durchsetztes, blaß angefärbtes Kolloid in wenigen Follikeln, diese nur

teilweise ausfüllend. Vereinzelte lymphocytär-histiocytäre, peri- und interfollikuläre Infiltrate. Bindegewebe und Gefäße sind ohne Besonderheiten.

Die *Schilddrüsen der Versuchstiere* zeigen nur in wenigen Fällen folgendes Bild: Aufbau aus größeren, vorwiegend runden bis ovalen Follikeln mit niedrig kubischem bis abgeflachtem einschichtigem Epithel und Kolloidtropfen im Cytoplasma. Follikelepithel zusammengesetzt aus kleineren, gleichmäßig angeordneten Zellen mit schmalem Cytoplasmaleib und kleineren, in Richtung der Follikelausdehnung gestreckten Zellkernen (Abb. 1a). Ausgesprochen basale Lage der Zellkerne; dabei auch hier deutliche Kernstrukturen, Nucleolus und Kernmembran sichtbar. Sehr selten sind Zellen in das Follikellumen abgesondert. Keine Zellproliferation des Follikelepithels. Die Follikel sind durchschnittlich mit inhomogenem Kolloid angefüllt. Der Kolloidreichtum gegenüber den Kontrolldrüsen ist auffallend (Abb. 1b). Das indifferent angefärbte Kolloid füllt in der Regel den ganzen Follikel aus. Leichte Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes und der lymphocytär-histiocytären Infiltrate. Die Gefäße zeigen auch hier keine Besonderheiten.

Es sei erwähnt, daß in den meisten Schilddrüsen der Versuchstiere ähnliche Bilder wie in den Kontrolldrüsen gesehen wurden.

Die beschriebenen Veränderungen genügen nicht, um Einblicke in die Funktion der Schilddrüse zu erhalten. Aus diesem Grunde wurde in beiden Tierserien der Glykogen-, Wasser- und Chlorgehalt der Leber und der Wassergehalt der Muskulatur bestimmt.

Die Bestimmung des Glykogengehaltes der Leber ergab für beide Tiergruppen keine nennenswerten Abweichungen. Die Durchschnittswerte in der Leber der Versuchstiere sind mit 0,62%/100 g Tier nur unwesentlich

Tabelle 2. *Wasser-, Glykogen- und Chlorgehalt der Leber.*

Tier-Nr.	Gewicht g	Wassergehalt %	Glykogengehalt %/100 g Tier	Chlor mg% (Trockensubstanz)
		Versuchstiere		
1—50	235	70,32	0,62	474,24
		$\sigma \pm$ 0,111	$\sigma \pm$ 0,425	$\sigma \pm$ 75,325
		$\varepsilon \pm$ 0,015	$\varepsilon \pm$ 0,061	$\varepsilon \pm$ 11,360
		Kontrolltiere		
1—10	238	70,55	0,49	437,64
		$\sigma \pm$ 0,108	$\sigma \pm$ 0,307	$\sigma \pm$ 72,200
		$\varepsilon \pm$ 0,035	$\varepsilon \pm$ 0,097	$\varepsilon \pm$ 14,553

erhöht gegenüber dem Glykogengehalt der Kontrolltiere mit 0,49%/100 g Tier. Die Unterschiede liegen innerhalb der Streubreite der Methode und sind nicht signifikant ($P < 0{,}3$). Ähnliche Ergebnisse erbringt auch die Untersuchung des Wasser- und Chlorgehaltes der Leber. Die in Tab. 2 angegebenen Werte lassen ausreichende Übereinstimmung der Chlorwerte und des Wassergehaltes erkennen. Die beobachteten Unterschiede sind ähnlich dem Verhalten der Glykogenwerte unbedeutend und liegen innerhalb der Streubreite.

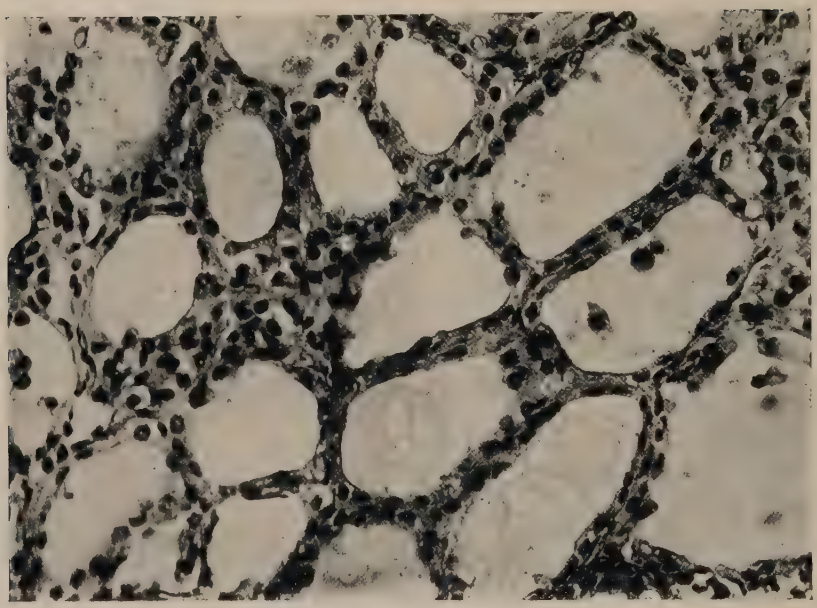


Abb. 1a.

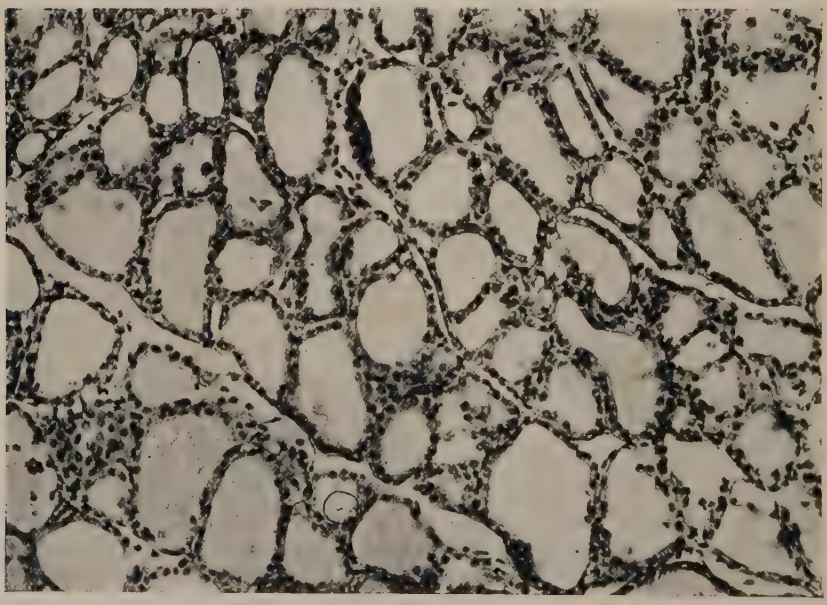


Abb. 1b.

Abb. 1a, b. Schilddrüse nach Atrophie der linken hinteren Extremität. Erläuterung siehe Text.
Leitz Panphot. H. E. Abb. 1a. Obj. 20; Ok. 10 Abb. 1b. Obj. 10; Ok. 10

Dieses Ergebnis wird unterstützt durch das analoge Verhalten des Wassergehaltes der Skeletmuskulatur (rechter Oberschenkel). Auch hier liegen die Werte mit 75,84% ($\sigma \pm 0{,}888$; $\varepsilon \pm 0{,}102$) für die Versuchstiere und 76,20% ($\sigma \pm 0{,}433$; $\varepsilon \pm 0{,}138$) bei den Kontrollen eng beieinander.

Das Verhalten von Leber und Skeletmuskulatur wird ergänzt durch den Sektionsbefund der Tiere. Es ließen sich keine Veränderungen nachweisen, die auf eine Über- oder Unterfunktion der Schilddrüse bzw. des Hypophysenvorderlappens bezogen werden konnten. Ödematöse Durchtränkung der Fettdepots[45, 46], Entleerung der Depots und Fettwanderung in die inneren Organe[47] wurden nicht beobachtet. Ebenso blieb die mit hyaliner (Zenkerscher) Degeneration, Verlust der Querstreifung, Ödembildung und lymphocytärer Infiltration[48–51] einhergehende Myopathie unbeobachtet. Die histologisch untersuchten Muskeln boten das Bild normaler quergestreifter Skeletmuskulatur. Weder myxödematöse Durchtränkung der Gewebe, noch Veränderungen im Feuchtigkeitsgehalt der Organe waren sichtbar.

Diskussion.

Die mitgeteilten Ergebnisse sind in doppelter Hinsicht bemerkenswert. Die deutliche Herabsetzung des Schilddrüsengewichtes nach Entwicklung der Muskelatrophie einer Extremität ist unverkennbar. Andererseits steht diesem Ergebnis eine — soweit das Allgemeinverhalten, der Glykogen-, Wasser- und Chlorgehalt der Leber betroffen sind — unveränderte Funktion der betreffenden Drüsen gegenüber. Dieser Befund ist nicht ungewöhnlich.

Gewichtsveränderungen der Schilddrüse sind ein geläufiges Ereignis bei normaler und gestörter Tätigkeit. Aus ihrer Richtung und ihrem Ausmaß lassen sich keine Rückschlüsse auf die Tätigkeit der Drüse ziehen. Zwar ist die bekannte Vergrößerung der Schilddrüse (Musitanus 1698 [52]) während des menstruellen Cyclus und der Schwangerschaft mit ihrem erhöhten Bedarf[3, 14] und der Steigerung des zirkulierenden Hormongehaltes[53–56] ebenso Ausdruck einer Hyperthyreose wie die echte hyperthyreotische Struma. Umgekehrt wird die Vergrößerung des Kolloidkropfes häufig von einer Hypothyreose begleitet (siehe Loeser[57], Bansi[58], Selye[3], Salter[14] u. a.). Die durch Mehrausschüttung des thyreotropen Hormons bedingte Aktivierung und Vergrößerung der Schilddrüse unter der Behandlung mit antithyreoidalen Substanzen mit ihrer funktionellen Unterwertigkeit[59–66] seien nur beiläufig erwähnt.

Analoge Bedingungen sind bei der Beurteilung des histologischen Bildes gegeben. Auch hier kann eine Diskrepanz zwischen Morphologie und Funktion vorhanden sein; so etwa bei der erwähnten Hypertrophie und Hyperplasie des Schilddrüsenparenchyms unter dem Einfluß antithyreoidaler Substanzen[67, 57]. Ebenso darf die bei alimentärem Jodmangel histologisch zunächst auftretende Aktivierung der Schilddrüse[68, 69, 58] hierher gerechnet werden. Erst im Stadium der Erschöpfung nach längerer Einwirkung des relativen oder absoluten Jodmangelzustandes entwickelt sich die typische Kolloidstruma, wobei jetzt Form und Funktion übereinstimmen. Ähnliche Abweichungen können sich auch zwischen histologischem Bild und

Fermentschädigung der Schilddrüse einstellen. So war es Skanse[70] möglich, durch Anwendung von radioaktivem Jod in sorgfältiger Dosierung Fermentschädigungen der Schilddrüse ohne morphologische Beeinträchtigung zu erzeugen.

Die oben geschilderten Merkmale weisen auf eine partiell herabgesetzte Tätigkeit der Drüse hin. Es besteht eine gewisse Ähnlichkeit mit den Schilddrüsen, die durch Verabreichung von Thyroxin über eine verminderte Tätigkeit des Hypophysenvorderlappens eine Involution erleiden[71–75]. Der gewichtsmäßige Unterschied zwischen den Schilddrüsen der Kontroll- und der Versuchstiere ist nicht von entsprechendem funktionellen Verhalten begleitet.

Der Vergleich der Glykogenwerte der Leber ist ein empfindliches Kriterium in beiden Tiergruppen. Schon leichtere Hyperthyreosen gehen mit Glykogenverarmung der Leber ohne Fetteinlagerung und Ketonkörperbildung einher[76], während intensive Steigerung der Schilddrüsentätigkeit zu anatomischen Veränderungen — z. B. ausgedehnten Leberzellnekrosen[77] oder Sklerosierung des Organs[78] — führen kann.

Inwieweit die von Hüter[79] erwähnte Aktivierung der Diastase durch das unter dem Einfluß des Schilddrüsenhormons aus Glucose entstehende Dioxyaceton den Glykogenabbau fördert, sei dahingestellt. Die Glykogenverarmung der Leber entsteht wahrscheinlich nicht durch direkten Angriff des Inkretes am Kohlenhydratstoffwechsel, sondern ist die Folge des gesteigerten Stoffwechsels und gesteigerter Verbrennungsvorgänge[76].

Beide Tiergruppen weisen einen übereinstimmenden Leberglykogengehalt auf. Dieser Befund kann neben dem Allgemeinverhalten der Tiere, dem Sektionsbefund sowie den Ergebnissen des Wasser- und Chlorgehaltes als Anzeichen eines nicht gestörten Stoffwechsels gelten.

Der Wasserhaushalt des Körpers ist neben verschiedenen anderen Regulationen der Einwirkung des Schilddrüsenhormons unterworfen. Weder Wasser- und Salzretention, noch Beeinflussung der Gewebeflüssigkeit durch Salz- und Wasserausschüttung[80–84] konnten beobachtet werden. Die wiedergegebenen Werte lassen keine Abweichungen erkennen.

Die mitgeteilten Befunde — gleiches funktionelles Verhalten der Drüsen bei unterschiedlichem Gewicht und gelegentlicher histologischer Abweichung — können einen Beitrag zur Schilddrüsenpathologie und des Versuches ihrer physiologischen Ausdeutung sein. Der Unterschied zwischen Tätigkeit und Form der Drüse wird durch die mitgeteilten Ergebnisse um ein weiteres Beispiel vermehrt. Man muß annehmen, daß durch die Atrophie einer Extremität der Bedarf und der periphere Verbrauch an Schilddrüsenhormon eingeschränkt sind. Die Schilddrüse des betreffenden Tieres erleidet gewissermaßen eine nützliche und kompensatorische „partielle Inaktivitätsatrophie". Dieser Zustand findet eine Analogie in

dem Verhalten der Schilddrüse bei Unterernährung. Die durch Fasten oder Unterernährung erzeugte Atrophie der Schilddrüse wird ebenfalls als nützliche und kompensatorische Maßnahme gedeutet, da bei Fehlen einer calorisch ausreichenden Ernährung ein Absinken des Grundumsatzes durch Schilddrüsenatrophie als günstig angesehen werden darf[3]. Unter normalen Umständen herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen stetigem hormonalen Abfluß von der Drüse in das zirkulierende Blut und dem Hormonverbrauch der Gewebe[14], so daß bei verringertem Verbrauch weniger Hormon gebildet bzw. abgegeben werden muß und damit gestapelt werden kann. Dieses Gleichgewicht wird nur zu einem Teil durch den Hypophysenvorderlappen geregelt, während unabhängig davon eine gewisse natürliche Aktivität der Schilddrüse vorhanden ist[14], ebenso wie nach Cortell und Rawson[74] die Einwirkung von Thyroxin und Jod die Schilddrüse nicht nur über den Hypophysenvorderlappen erreicht, sondern ein direkter peripherer Effekt nachweisbar bleibt.

Der Hormonbedarf der Gewebe wechselt mit dem Allgemeinzustand und der Stoffwechsellage[85], dennoch lassen sich Aussagen über ihn machen. So entspricht das Verhalten des Grundumsatzes nach Thyroxinapplikation ungefähr einer logarithmischen Funktion der verabfolgten Dosis [85, 86, 87], und Magnus-Levy[88] konnte zeigen, daß beim Kretin nach Absetzen der Schilddrüsentherapie der Grundumsatz in umgekehrter logarithmischer Form absinkt. Man darf daraus schließen, daß der Organismus jeden Tag einen konstanten Prozentsatz seines in den Geweben vorhandenen Hormonvorrates verbraucht. Dieser Verbrauch ist abhängig von der allgemeinen Stoffwechsellage, infolgedessen ist z. B. die Sekretionsrate des Schilddrüsenhormons in jüngerem Alter größer, während sie mit fortschreitendem Alter entsprechend der Reduktion der Stoffwechselvorgänge absinkt (Maqsood[89, 90]).

Der Verbrauch des zirkulierenden Schilddrüsenhormons durch die Gewebe ergibt sich aus der Beteiligung an zahlreichen fermentativen Umsetzungen. So greift das Schilddrüsenhormon vermutlich über Oxydo-Reduktionsvorgänge in den Stoffwechsel ein, wie z. B. für das Wasserstoffion, Thiamin[91], für die Verarmung der Gewebe an Thiamin, Pantothensäure und Pyridoxin bei Hyperthyreosen[92] nachgewiesen werden konnte. Da die Konzentration von Oxydasen[93] und Hydrolasen[94] in Zellen dem Einfluß des Schilddrüsenhormons untersteht, ferner die Tätigkeit der Muskelhexokinase und Succinoxydase[95], der d-Aminosäureoxydase[96, 97], der Cytochromoxydase[98] sowie der Cytochrom c-Gehalt der Gewebe[99], die Milchsäuredehydrase der Leber[100] und die Pseudocholinesterase[101] ist es verständlich, wenn im Gefolge der Herabsetzung des Stoffwechsels einer Extremität ein Minderverbrauch an Schilddrüsenhormon entsteht.

Die geschilderten Veränderungen der Schilddrüse können somit als Ausdruck einer peripher ausgelösten kompensatorischen, partiellen Inaktivitätsatrophie aufgefaßt werden.

Zusammenfassung.

Es wird der Einfluß der Muskelatrophie auf die Schilddrüse untersucht. Die durch Entfernung des N. ischiadicus erzeugte Atrophie einer Extremität erzeugt deutliche Herabsetzung des Schilddrüsengewichtes.

Funktionell bestehen keine Abweichungen zu den Kontrollen. Die gefundenen Veränderungen werden als kompensatorische, partielle Inaktivitätsatrophie der Schilddrüse gedeutet. Die Zusammenhänge werden besprochen.

Literatur.

[1] Gaarenstroom, J. H.: Ned. T. Geneesk. **1942**, 1181; Acta brev. neerl. Physiol. **12**, 107 (1942). — Kleinsorg, H., u. A. Loeser: Arch. int. Pharmacodynamie **79**, 83 (1949). — [3] Selye, H.: Textbook of Endocrinology. Montreal 1947. — [4] Maqsood, M.: Nature **167**, 323 (1951). — [5] Maqsood, M.: J. Endocrinology **7**, 82 (1950). — [6] Maqsood, M., and E. P. Reineke: Amer. J. Physiol. **162**, 24 (1950). — [7] Hoskins, R. G.: J. Amer. Med. Assoc. **55**, 1724 (1910). — [8] Herring, P. T.: Quart. J. Exper. Physiol. **11**, 47 (1917). — [9] Cohen, R. S.: Amer. J. Anat. **56**, 143 (1935). — [10] Schmidt, L. H., and I. G. Schmidt: Endocrinology **23**, 553 (1938). — [11] Deane, H. E., and R. O. Greep: Endocrinology **41**, 243 (1947). — [12] Wallach, D. P., and E. P. Reineke: Endocrinology **45**, 75 (1949). — [13] Maqsood, M.: Nature **166**, 692 (1950). — [14] Salter, W. T.: in Pincus, Gr., and K. V. Thimann: The Hormones. II. New York 1950. — [15] Richardson, H. B., and H. G. Wolff: J. Clin. Invest. **12**, 966 (1933). — [16] Cohen, S. J., and F. H. King: Arch. Neurol. **28**, 1338 (1932). — [17] Bodansky, M., and O. Bodansky: Biochemistry of Disease. New York 1945. — [18] Ayer, J. B., J. H. Means and J. Lerman: Endocrinology **18**, 701 (1934). — [19] Lahey, F. H.: J. Amer. Med. Assoc. **87**, 754 (1926). — [20] Askanazy, M.: Dtsch. Arch. klin. Med. **61**, 118 (1898). — [21] Huf, E. G., and E. Fischer: Amer. J. Physiol. **159**, 6 (1949). — [22] Diaz-Guerrero, R., and J. D. Thomson: Fed. Proc. **6**, 97 (1947). — [23] Feinstein, B., R. E. Pattle and G. Weddell: J. Neurol. **8**, 1 (1945). — [24] Shorr, E., H. B. Richardson and J. S. Mansfield: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **32**, 1340 (1935). — [25] Thorn, G. W.: Endocrinology **20**, 628 (1936). — [26] Thorn, G. W., and H. A. Eder: Amer. J. Med. Sci. **1**, 583 (1946). — [27] Cowan, D. W.: Amer. J. Physiol. **109**, 312 (1934). — [28] Bodansky, M.: J. Biol. Chem. **109**, 615 (1935). — [29] Bodansky, M., and J. F. Pilcher: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **32**, 597 (1935). — [30] Sjoerdsma, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **76**, 126 (1951). — [31] Keeser, E.: Klin. Wschr. **1948**, 76. — Ärztl. Forschg. **1949**, 243. — Klin. Wschr. **1950**, 494. — [32] Shorr, E.: Macy Foundation Conference on Metabolic Aspects of Convalescence. June. 1944. — [33] Shorr, E., H. B. Richardson and H. G. Wolff: J. Clin. Invest. **12**, 966 (1933). — [34] Askonas, Br. A.: Nature **167**, 933 (1951). — [35] Wang, E.: Acta med. scand. (Stockh.) **169**, 81 (1946). — [36] Grumbrecht, P., u. A. Loeser: Klin. Wschr. **1939**, 1018. — [37] Grumbrecht, P., u. A. Loeser: Klin. Wschr. **1939**, 1019. — [38] Grumbrecht, P., u. A. Loeser: Klin. Wschr. **1939**, 1021. — [39] Kopf, R., A. Loeser u. G. Meyer: Klin. Wschr. **1948**, 202. — [40] Grumbrecht, P., u. A. Loeser: Arch. exp. Path. Pharmakol. **189**, 345 (1938). — Arch. Gynäk. **167**, 199 (1938). — [41] Loeser, A.: Trans. Third International Goiter Conf. **1938**, 492. — [42] Good, C. A., H. Kramer and M. Somogyi: J. Biol. Chem. **100**, 485 (1933). — [43] Lang, K.: Biochem. Z. **290**, 289 (1937). — [44] Burn, J. H.: Biologische Auswertungsmethoden Berlin 1937. — [45] Smelser, G. K.: Amer. J. Path. **15**, 341 (1939). — [46] Dobyns, B. M.: Surg. etc. **82**, 609 (1946). — [47] Anselmino, K. J., F. Hoffmann u. E. Rhoden: Pflügers Arch. **237**, 515 (1936). — [48] Smelser, G. K.: Amer. J. Ophthalm. **20**, 1189 (1937). — [49] Smelser, G. K.: Amer. J. Ophthalm. **22**, 1201 (1939). — [50] Paulson, D. L.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **36**, 604 (1937). — [51] Paulson, D. L.: Trans. Amer. Ass. Study Goiter **309** (1940). — [52] Musitanus: Chirurgia theoretica-practica, 1, Cap. 45. „De Bocio", Lugduni 1698. — [53] Bokelmann, O., u. W. Scheringer: Arch. Gynäk. **143**, 512 (1930). — [54] Leipert, T.: Biochem. Z. **270**, 448 (1934). — [55] Leitsch, J.: Internat. Goiter Conf. Bern 1927. — [56] Peters,

J. P., E. B. Man and M. Heinemann: Obstet. Gynecol. Survey **3**, 5 (1948). — [57] Loeser, A.: Dtsch. med. Wschr. **1950**, 36, 77. — [58] Bansi, W. H.: Klin. Wschr. **1951**, 33. — [59] Astwood, E. B.: J. Pharmacol. **78**, 79 (1943). — [60] Astwood, E. B., J. Sullivan, A. Bissell and R. Tyslowitz: Endocrinology **32**, 210 (1943). — [61] Astwood, E. B., and A. Bissell: Endocrinology **34**, 282 (1944). — Astwood, E. B., A. Bissell and A. M. Hughes: Endocrinology **37**, 456 (1945). — [62] Loeser, A.: Dtsch. med. Wschr. **1941**, 615. — [63] Mackenzie, J. B., C. G. Mackenzie and E. V. McCollum: Science (Lancaster, Pa.) **94**, 518 (1941). — Mackenzie, J. B., and C. G. Mackenzie: Fed. Proc. **1**, 122 (1942). — Mackenzie, C. G., and J. B. Mackenzie: Endocrinology **32**, 185 (1943). — [64] Kopf, R., A. Loeser u. G. Meyer: Klin. Wschr. **1948**, 202. — Dtsch. med. Wschr. **1948**, 512. — [65] Freiesleben, E., u. K. Kjerulf-Jensen: Acta pharmacol. toxicol. **2**, 307 (1946). — [66] Kopf, R., A. Loeser, G. Meyer u H. J. Bielig: Arch. exp. Path. Pharmakol. **207**, 256 (1949). — [67] Salter, W. T., R. E. Cortell and E. A. McKay: J. Pharmacol. **85**, 310 (1945). — [68] Marine, D.: Die Drüsen mit innerer Sekretion. Wien 1937. — [69] Blum, F.: Endokrinol. **19**, 19 (1937). — [70] Skanse, B. N.: The Biological Effect of Irradiation by Radioactive Iodine in Brookhaven Conference Rep. **1948**, 12. — [71] Cameron, A. T., and J. Carmichael: J. Biol. Chem. **45**, 69 (1920). — [72] Loeb, L., R. B. Bassett and H. Friedman: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **28**, 209 (1930). — [73] Loeser, A.: Arch. exp. Path. Pharmakol. **176**, 697 (1934). — [74] Cortell, R., and R. W. Rawson: Endocrinology **35**, 488 (1944). — [75] Dörrie, H.: Geburtsh. Frauenheilkde **10**, 684 (1950). — [76] Jores, A.: Klin. Wschr. **1946**, 97. — [77] Gerlei, F.: Ann. Anat. path. et Anat. normale méd. chir. **10**, 555 (1933). — [78] Rössle, R.: Virchows Arch. **291**, 1 (1933). — [79] Hüter, Fr.: Pharmazie **5**, 249 (1950). — [80] Leichenstern, O.: Dtsch. med. Wschr. **1893**, 1297, 1333, 1354. — [81] Greene, J. A., and R. P. Luce: J. Nutrit. **4**, 371 (1931). — [82] Deutsch, G.: Dtsch. Arch. klin. Med. **134**, 342 (1920). — [83] Thompson, W. O.: J. Clin. Invest. **2**, 477 (1925/26). — [84] Fujimaki, Y., u. F. Hildebrandt: Arch. exp. Path. Pharmakol. **102**, 226 (1924). — [85] Salter, W. T.: Physiol. Rev. **20**, 365 (1940). — [86] Boothbey, W. M., and E. Baldes: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic **1**, 166 (1926). — [87] Thompson, W., P. K. Thompson, A. Brailey and A. Cohen: J. Clin. Invest. **7**, 437 (1929). — [88] Magnus-Levy, A.: Klin. Med. **43**, 201 (1904). — [89] Maqsood, M.: Nature **166**, 735 (1950). — [90] Maqsood, M.: Exper. **7**, 150 (1951). — [91] Salter, W. T.: Trans. Amer. Assoc. Study Goiter **1946**, 145. — Salter, W. T., and A. W. Mac Johnston: Trans. Assoc. Amer. Physicians **61**, 210 (1948). — Salter, W. T.: Amer. N. Y. Acad. Sci. **50**, 358 (1949). — Green, M. A., M. G. Ettlinger and E. B. Astwood: J. Clin. Endocrinology **9**. 1069 (1949). — [92] Drill, V. A.: Physiol. Rev. **23**, 355 (1943). — [93] Cohen, R. A., and R. W. Gerard: J. Cell. Comp. Physiol. **10**, 223 (1937). — [94] Scharles, F. H., P. D. Robb and W. T. Salter: Amer. J. Physiol. **111**, 130 (1935). — [95] Smith, R. H., and H. G. Williams-Ashman: Nature **164**, 457 (1949). — [96] Klein, J. R.: J. Biol. Chem. **128**, 659 (1939). — [97] Cagan, R. N., J. L. Gray and H. Jensen: J. Biol. Chem. **183**, 11 (1950). — [98] Tipton, S. R., M. J. Leath, I. H. Tipton and W. L. Nixon: Amer. J. Physiol. **145**, 693 (1945/46). — [99] Drabkin, D. L.: J. of Biol. Chem. **182**, 335 (1950). — [100] Vestling, C. S., and A. A. Knoepfelmacher: J. Biol. Chem. **183**, 63 (1950). — [101] Hawkins, R. D., M. Nishikawara and B. Mendel: Endocrinology **43**, 167 (1948). — [102] Linder, A.: Statistische Methoden. Basel 1945.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 392—397 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut und der Röntgenabteilung der Medizinischen Klinik der Universität Rostock.

Über den Mechanismus der Ultraschallwirkung.

Von

P. Holtz und W. S. Reichel sowie A. Engelhardt, V. Henke und H. J. Schümann.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. Oktober 1951.)

Die Vorstellungen vom Mechanismus der Ultraschallwirkung auf biologische Substrate sind verschieden. Auf der einen Seite sollen die mit der Ultrabeschallung verbundenen *thermischen* Effekte am Zustandekommen der biologischen Wirkungen wesentlich beteiligt sein, andererseits wird den *mechanischen* Wirkungen, die bei *hoher* Dosierung zur Cavitation, zu Gewebszerreißungen und -zerstörungen führen können, ursächliche Bedeutung auch für das Auftreten der therapeutischen Effekte bei *niedriger* Dosierung zugeschrieben. Demgegenüber hielten wir es für möglich, daß *chemische Wirkungen*, insbesondere das Freiwerden pharmakologisch wirksamer Substanzen im beschallten Gewebe Ursache der biologischen Effekte sind. So ist z. B. bekannt, daß intensive Beschallungen der Haut zu lokaler Hyperämie und zur Quaddelbildung führen können. Die Ursache könnte vielleicht eine rein mechanische oder thermische Gewebsschädigung sein, die zu einer erhöhten Capillarwanddurchlässigkeit führt. Andererseits könnte das Freiwerden *histaminähnlicher* Substanzen wie nach Ultraviolettbestrahlungen und Verbrennungen Ursache dieser Effekte sein.

Wir haben versucht, an einigen einfachen biologischen Testobjekten das Freiwerden pharmakologisch wirksamer Substanzen im beschallten Gewebe nachzuweisen:

1. Zu den histaminreichsten Organen des Körpers gehört neben der Haut die Lunge. Wir haben isoliert durchströmte Meerschweinchen*lungen* mit U.S. behandelt und das Perfusat am isolierten Meerschweinchen*darm* auf Histamin untersucht. Die Abb. 1 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches.

Methodik. Die Lungen frisch getöteter Meerschweinchen wurden mit Hilfe einer durch den re. Ventrikel in die Art. pulmonalis eingeführten Glaskanüle aus einer mit körperwarmer, O_2-gesättigter Tyrodelösung gefüllten Mariotteschen Flasche unter einem hydrostatischen Druck von ungefähr 20—25 cm durchströmt. Die Durchströmungsflüssigkeit tropfte aus dem li. Vorhof ab.

Für die *Beschallung* stand ein Gerät der VEM Dresden zur Verfügung, das bei einer Frequenz von 800 kHz eine Schalleistung bis 4 W/cm² bei 6,5 cm² schallabstrahlender Fläche am Sendekopf ermöglichte. Die Wellenlänge der Strahlung

errechneten wir nach der Formel von Willard mit 1,9 mm in Wasser, die Halbwerttiefe in Muskulatur mit 3,5 cm. Die Lunge wurde während der Durchströmung unter Wasserankoppelung und Variation der Intensität und Dauer beschallt.

Die aufgefangene Perfusionsflüssigkeit wurde am isolierten Meerschweinchendarm, der nach der Methode von Magnus in 10 cm³ Tyrode suspendiert war, auf Histamin untersucht.

Das vor der Beschallung aufgefangene Perfusat war unwirksam. Demgegenüber verursacht 1 cm³ des Perfusats (P_2), das während der Beschallung mit einer sehr geringen Intensität erhalten wurde, eine

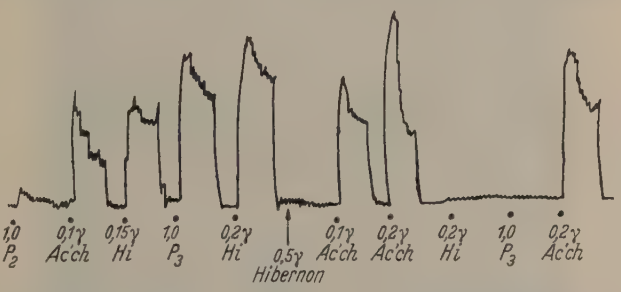


Abb. 1. *Histaminähnliche Wirkung des Perfusats einer mit Ultraschall behandelten Meerschweinchenlunge.* — *Meerschweinchendarm* in 20 cm Tyrode. — P_2, P_3 = Perfusate während Beschallung mit 0,5 Watt bzw. 2 Watt (3 min lang). — Hi = Histamin; Ac'ch = Acetylcholin.

geringfügige Darmkontraktion, die sehr viel stärker ausfällt, wenn man das Perfusat zusetzt, das aus einer Beschallungsperiode von 4fach höherer U.S.-Intensität stammt. 1 cm³ dieses Perfusats (P_3) ist so darmwirksam wie 0,2 γ *Histamin* und etwas wirksamer als 0,1 γ *Acetylcholin*.

Die *Identität* des von der beschallten Lunge an das Perfusat abgegebenen darmerregenden Stoffes mit *Histamin* ließ sich dadurch wahrscheinlich machen, daß *Atropin* die Acetylcholinwirkung verhinderte, nicht aber die Wirkung des Histamins und der wirksamen Substanz des Perfusates, was auf der Kurve nicht abgebildet ist. Die wirksame Substanz des Perfusates war jedoch ebenso wie reines Histamin nach Vorbehandlung des Darmes mit einem *Antihistaminicum* — *Hibernon*[1] — unwirksam. Es ist demnach zumindest sehr wahrscheinlich, daß unter der Einwirkung des Ultraschalles in der Meerschweinchenlunge Histamin freigesetzt wurde. — Die gefäßerweiternde Wirkung des Histamins könnte sodann die Ursache für die während der Beschallung beobachtete Zunahme der Tropfenzahl der die Lunge durchfließenden Tyrodelösung sein. Diese nahm im 1. Fall bei weniger intensiver Beschallung (0,5 Watt) von 14 auf 22 Tropfen pro Minute, im 2. Fall mit der höheren U.S.-Dosis (2 Watt) von 14 auf 29 Tropfen pro Minute zu.

[1] p-Brombenzyl-α-pyridyl-dimethyl-aminoäthylamin hydrochlor., von der Diwag als Antiallergicum in den Handel gebracht. Herrn Dr. Credner, Hannoversch-Münden, danken wir für die Überlassung des Präparates.

2. In weiteren Versuchen haben wir den Meerschweinchendarm, der in den soeben geschilderten Versuchen nur Testobjekt zum Nachweis von Histamin war, selbst mit Ultraschall behandelt in der Erwartung, daß auch aus dem Darmgewebe eine pharmakologisch wirksame Substanz frei würde. Das isolierte Darmstück von ca. 3 cm Länge war in 10 oder 20 cm^3 körperwarmer Tyrodelösung suspendiert. Das Versuchsgefäß aus Glas befand sich in einem Wasserthermostaten. Der Schallkopf der Apparatur wurde unter Wasser in 2—3 cm Entfernung vom

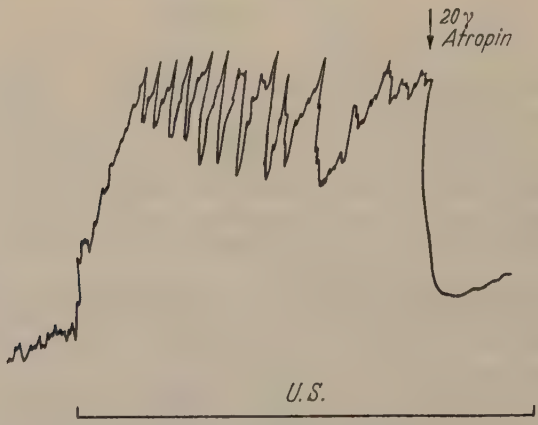


Abb. 2. *Acetylcholinähnliche Kontraktion des Meerschweinchen-Ileums während Ultraschalleinwirkung (U.S. — 1,5 Watt, 7 min lang).*

Versuchsgefäß angebracht. Die Beschallung mit einer verhältnismäßig kleinen Dosis — 1,5 Watt — führt zu einer starken Darmkontraktion, die während der 7 min dauernden Beschallung anhält, bis dann bei fortgesetzter Beschallung 20 γ Atropin zugesetzt wurden und eine sofortige Aufhebung der Darmkontraktion verursachten (Abb. 2). — Auch am *Kaninchendarm* kommt es während der Beschallung zu einer Stimulierung der Darmmotorik, die sich durch Atropin beseitigen läßt, wie andererseits die Atropinisierung des Darmes die sonst auftretende U.S.-Kontraktion des Darmes verhindert. Auch Acetylcholin (2 γ) ist dann natürlich unwirksam.

Auf Grund dieser Ergebnisse läßt sich, wie wir glauben, mit Sicherheit ausschließen, daß die durch den U.S. verursachte Darmkontraktion — wenigstens innerhalb des von uns angewandten Dosierungsbereiches — auf einer direkten Beeinflussung der glatten Muskulatur des Darmes beruht; es ist vielmehr so gut wie sicher, daß — wie es in der beschallten Lunge zum Freiwerden von Histamin kam — so jetzt im beschallten Darm Acetylcholin in Freiheit gesetzt wurde und die Darmkontraktion auslöste. Dafür spricht dann auch, daß — wie die Abb. 3 zeigt — die in

diesem Fall nicht sehr starke Darmerregung nach der kleinen Ultraschall-Dosis von nur 1,5 Watt durch Vorbehandlung des Darmes mit *Eserin*, das die Cholinesterase blockiert, der Effekt sich sehr deutlich verstärken läßt.

Das durch die Beschallung freiwerdende Acetylcholin diffundiert zum Teil in die Tyrodelösung hinein, in welcher der Darm suspendiert

Abb. 3. *Verstärkung der darmerregenden Wirkung des Ultraschalls (U.S.) durch Physostigmin (Eserin).*

ist. Es ist bekannt, daß auch von einem normalen Darmpräparat kleine Acetylcholinmengen an die Badflüssigkeit abgegeben werden.

In dem in der Abb. 4 abgebildeten Versuch wird bei 1 die mit Eserin versetzte Tyrodelösung (10 cm³), in welcher der normale, nicht beschallte Darm ½ Std suspendiert war, auf den besonders acetylcholinempfindlichen, ebenfalls eserinisierten Blutegel-Rückenmuskel einwirken gelassen; bei 2 (nach „U.S.“) in gleicher Weise die Tyrodelösung, in welcher der Darm während ½ Std einer intermittierenden Ultrabeschallung (5 mal je 2 min 1,5 Watt) ausgesetzt war. Die mindestens doppelt so starke Kontraktion des Blutegelmuskels spricht dafür, daß unter der Wirkung des Ultraschalls Acetylcholin vermehrt freigesetzt wurde und in die umgebende Tyrodelösung diffundierte, so daß eine *„humorale Übertragung“* auf den Blutegelmuskel möglich wurde.

Zur weiteren Identifizierung der durch die Beschallung in Freiheit gesetzten Substanz und der Lokalisierung ihres Angriffspunktes wurden mehrere Versuche am Meerschweinchendarm als Testobjekt mit *Curare* gemacht, das ähnlich wie die motorische Endplatte des quergestreiften Muskels und die vegetativen Ganglien,

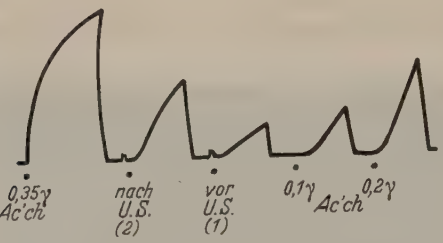


Abb. 4. *„Humorale Übertragung" des vom isolierten Meerschweinchendarm während der Beschallung vermehrt abgegebenen Acetylcholins.* (Erklärung im Text.)

so auch die nervöse Substanz des Auerbach*schen Plexus* blockiert, so daß hier angreifende Pharmaka, z. B. Nicotin unwirksam bleiben. 20 γ Nicotin, die zu einer starken Darmerregung geführt hatten, erwiesen sich nach Curare als gänzlich wirkungslos. Acetylcholin hingegen hatte ebenso wie die durch die Beschallung freigesetzte Substanz auch nach Curare noch seine Wirksamkeit behalten.

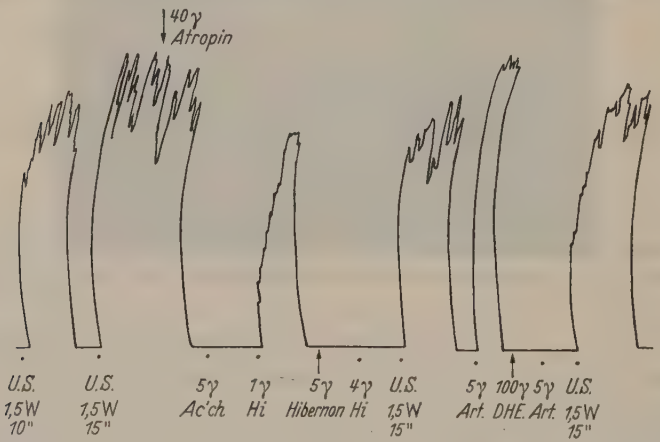


Abb. 5. *Ultraschallwirkung am graviden Meerschweinchenuterus. Vergleich mit Histamin, Acetylcholin und Arterenol.* — Ac'ch = Acetylcholin; Hi = Histamin; Art. = Arterenol; DHE = Dihydroergotamin.

Es kann also kaum zweifelhaft sein, daß die Ultraschallwirkung auf den Darm *Acetylcholin* freisetzt.

3. Ließen sich somit die durch Beschallung freiwerdenden pharmakologisch wirksamen Stoffe im Falle der Meerschweinchenlunge als Histamin, im Falle des Meerschweinchen- und Kaninchendarmes als Acetylcholin identifizieren, so treten bei der Beschallung des *Uterus* Wirkungen auf, die sich wenigstens nicht so ohne weiteres auf das

Freiwerden eines bekannten Wirkstoffes zurückführen lassen. Am nichtgraviden Kaninchenuterus kam es nach wiederholter Einwirkung kleiner Ultraschalldosen zum Auftreten rhythmischer, wehenartiger Kontraktionen, die sich durch Adrenalin, nicht aber durch Atropin hemmen ließen. — In einem Versuch am graviden Meerschweinchenuterus (Abb. 5) kam es zu starken Kontraktionen bei der Beschallung, die sich weder durch Atropin, noch durch Antihistaminica, noch durch Sympathicolytica verhindern ließen, also weder durch Acetylcholin, noch durch Histamin, noch durch Adrenalin oder Arterenol verursacht sein konnten.

Zusammenfassung.

Bei der Beschallung überlebenden Gewebes kommt es zum Freiwerden pharmakologisch wirksamer Stoffe, die im einen Fall, nämlich an der durchströmten Lunge, mit *Histamin*, im anderen Fall, nämlich am isolierten Darm mit *Acetylcholin* identifiziert werden konnten, und an einem dritten biologischen Objekt, nämlich dem isolierten Uterus weder mit Histamin, noch mit Acetylcholin identisch waren. Es wird damit verständlich, daß der Ultraschall ähnliche Wirkungen hervorrufen kann wie die kurzwelligen Strahlen des Ultravioletts, von denen bekannt ist, daß sie das Freiwerden pharmakologisch wirksamer Gewebsstoffe veranlassen.

Nur ist der *physikalische* Mechanismus, welcher der Wirkung des Ultraschalls und der ultravioletten Strahlen zugrunde liegt, ein grundverschiedener, und verschieden sind deshalb auch die *Indikationsgebiete* für die therapeutische Anwendung. Unter diesen Gesichtspunkten erscheint es uns von Bedeutung, daß die von uns beobachteten Effekte mit Ultraschalldosierungen erhalten wurden, die *innerhalb* des therapeutisch in Frage kommenden Dosierungsbereiches liegen.

Prof. Dr. P. Holtz, (3a) Rostock, Gertrudenstr. 9, Pharm. Inst. d. Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 398—403 (1952).

Aus der Augenklinik der Universität Würzburg.

Histochemische Untersuchungen an der Cornea über den Einfluß von Monojodessigsäure, Phlorrhizin und Hyaluronidase auf die alkalische Phosphatase.

Von

H. Grethe, V. Köhler, W. Münich und J. Scharf.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 23. Oktober 1951.)

Monojodessigsäure (MJE)[1, 2] und Phlorrhizin (Phz)[3, 4] hemmen mit Oxyreduktionen die Phosphorylierung der Glucose[5, 6]. Hübner und Verzár zeigten die Hemmung der Phosphorylierung des Lactoflavins durch kleine Mengen von MJE in vitro[7].

In den folgenden Untersuchungen soll geprüft werden, ob MJE, Phz und Hyaluronidase die Glycerophosphat spaltende alkalische Phosphatase der Cornea beeinflussen.

Methodik.

In 20 Versuchsreihen kamen lebenswarme Hornhäute von Rind und Kalb zur Untersuchung. Bei jeder Versuchsreihe wurden 6 Teile von gleicher Größe derselben Hornhaut verwendet. MJE und Phz lagen in reiner Form, Hyaluronidase als „Kinetin" der Fa. Schering-Berlin vor. Alle Lösungen hatten nach Zugabe von Natriumbicarbonat das gleiche p_H. Die Konzentration der Lösungen wurde konstant gehalten. Die Dauer ihrer Einwirkung war in jeder Versuchsreihe einheitlich auf 20 min begrenzt. Die einzelnen Corneateilchen wurden eingelegt in:

4 cm³ MJE 1 : 1000 + 1 cm³ 0,9%ige NaCl-Lösung,
4 cm³ Phz 0,872% + 1 cm³ 0,9%ige NaCl-Lösung,
1 cm³ Kinetin (5 Schering-Einheiten (Sch.E.)) + 4 cm³ 0,9%ige NaCl-Lösung,
1 cm³ Kinetin (5 Sch.E.) + 4 cm³ MJE 1 : 1000,
1 cm³ Kinetin (5 Sch.E.) + 4 cm³ Phz 0,872%.

Zur Kontrolle der normalen Phosphataseaktivität wurde ein unbehandeltes Corneastückchen sofort in die Fixierungsflüssigkeit (80%iger Alkohol) gebracht.

Die histochemische Darstellung der alkalischen Phosphatase erfolgte nach den Vorschriften von Gomori[8]. Als Substrat diente Natriumglycerophosphat bei p_H 9,4. Die Kontaktzeiten differierten zwischen 30 min und 48 Std. Temperatur im Thermostaten war 37° C.

Die Schnittdicke betrug 6 μ. Es wurde darauf geachtet, daß alle Schnitte gleich dick waren, eine für die Beurteilung der Fermentaktivität unerläßliche Voraussetzung.

Versuchsergebnisse.

Im Epithel der normalen Hornhaut von Kalb und Rind gelingt der histochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase, die aus Natriumglycerophosphat Phosphat-Ionen abspaltet (Süllmann[9]). Die positive

Phosphatasereaktion besteht je nach Aktivität in einer schwarzen bis dunkelbraunen Farbtönung am Orte der Substratspaltung.

Die Abb. a, b, c, A, B, C, d, e, f zeigen als Beispiele die Ergebnisse einer Versuchsreihe an der Cornea des Kalbes nach 20 min-langer Einwirkung der 3 Testlösungen und darauffolgenden Kontaktzeiten von 4 bzw. 48 Std mit Natriumglycerophosphat bei 37° C.

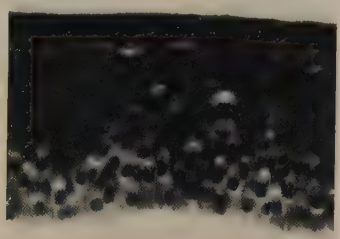


Abb. a: Cornea unbehandelt. Normale Phosphataseaktivität des Epithels. Kontaktzeit 4 Std.

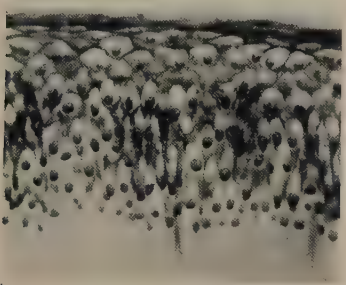


Abb. b: Hemmung der Phosphataseaktivität des Epithels durch MJE. Kontaktzeit 4 Std.

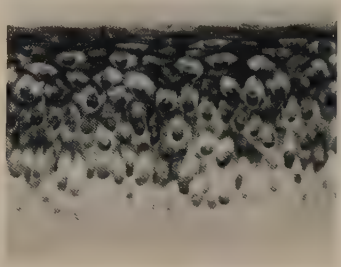


Abb. c: Hemmung der Phosphataseaktivität des Epithels durch Phz. Kontaktzeit 4 Std.

Abb. a zeigt die Phosphatasereaktion einer unbehandelten Kalbshornhaut. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase nimmt von den basalen zu den oberflächlichen Zellschichten des Epithels zu. Die in den Basalzellen erkennbaren Unterschiede der Aktivität zwischen Kern und Plasma verlieren sich gegen die Oberfläche hin. Die Struktur der obersten Epithelschichten wird durch die einheitliche Schwarzfärbung fast unsichtbar.

Abb. b demonstriert den Einfluß der MJE, Abb. c den des Phz. Beide Male ist die Abnahme der Fermentaktivität signifikant, insbesondere in den untersten Epithelschichten.

Bei der Verlängerung der Kontaktzeit auf 48 Std werden die festgestellten Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle (Abb A) und dem MJE- (Abb. B) bzw. Phz-Präparat (Abb. C) ebenfalls erhalten.

Dazu kommt, daß die gomori-positiv gewordenen fixen Hornhautzellen auf MJE und Phz desgleichen im Sinne eines Aktivitätsrückganges reagieren.

Abb. A: Cornea unbehandelt. Starke Phosphataseaktivität des Epithels. Kontaktzeit 48 Std. Fixe Hornhautzellen positiv.

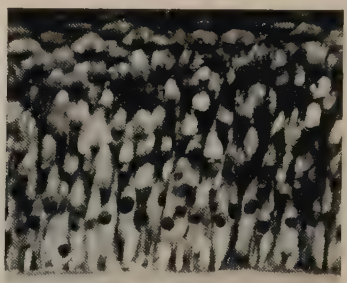


Abb. B: Hemmung der Phosphataseaktivität des Epithels und der fixen Hornhautzellen durch MJE. Kontaktzeit 48 Std.

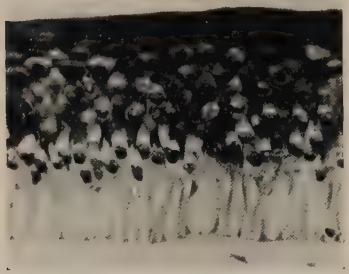


Abb. C: Hemmung der Phosphataseaktivität des Epithels und der fixen Hornhautzellen durch Phz. Kontaktzeit 48 Std.

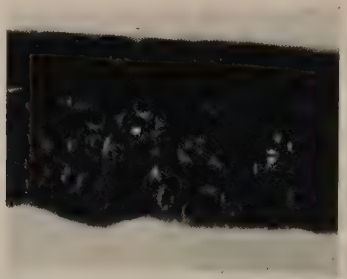


Abb. d: Nach Hyaluronidase gleichmäßig starke Phosphataseaktivität des gesamten Epithels. Kontaktzeit 4 Std.

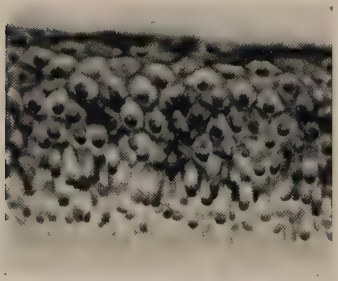


Abb. e: Hemmung der durch Hyaluronidase modifizierten Phosphataseaktivität des Epithels durch MJE. Kontaktzeit 4 Std.

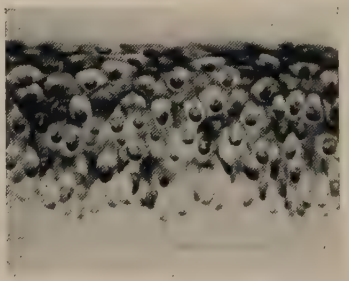


Abb. f: Hemmung der durch Hyaluronidase modifizierten Phosphataseaktivität des Epithels durch Phz. Kontaktzeit 4 Std.

Die Versuche mit Hyaluronidase zeigen in einem Drittel der Untersuchungen (d) eine auffallende Gleichmäßigkeit der Fermentaktivität des Hornhautepithels, die offenbar durch eine überall in der Cornea quantitativ gleiche Aktivierung des Fermentes zustande kam. Es hat

den Anschein, als ob Hyaluronidase die potentielle Fermentaktivität realisiere. Die übrigen $^2/_3$ der Versuche waren in dieser Hinsicht nicht einheitlich. Möglicherweise bringt eine andere Versuchsanordnung eine größere Übereinstimmung der Ergebnisse. Die Fermenthemmung durch MJE und Phz war in allen Versuchen mit Hyaluronidase dagegen konstant (e, f).

Besprechung.

Der Zusammenhang zwischen erhöhter Aktivität der alkalischen Gewebsphosphatase und Steigerung des Stoffwechsels des entsprechenden Organes ist erwiesen[10, 11, 12, 13]. Ein „Streß" wie Formalin erhöht die Aktivität der alkalische Phoshpatase in Leber, Milz, Lymphknoten und Lunge[10]. Die alkalischen Lungenphosphatase wird auch durch Tbc-Bacillen und Histamin aktiviert[14]. Wahrscheinlich geht dementsprechend eine Hemmung ihrer Aktivität mit einer Minderung des Stoffumsatzes einher. Derartige Verhältnisse dürften aber durch eine herabgesetzte Reaktionsfähigkeit der Zelle, weiterhin des Mesenchyms gegenüber Reizen gekennzeichnet sein. Es ist möglich, daß daraufhin das Mesenchym einen Teil seiner Abwehrfunktionen verliert. Cortison mit seiner bereits erwiesenen negativen Korrelation zum Mesenchym[15, 16], die sich bei der allergischen und nichtallergischen Entzündung als unspezifischer antiphlogistischer Effekt äußert[17, 18], hemmt außer der Aminooxydase[19] und Arginase[20] die Hyaluronidase[21, 22] und alkalische Phosphatase[23]. MJE und Phz schränken desgleichen die Reagibilität der Cornea[24, 25], des Muskels[26], der Gelenke[27] und der neutrophilen Mikrophagen[28, 29, 30] gegenüber einem Entzündungsreiz ein. Außer der alkalischen Gewebsphosphatase hemmen MJE und Phz[39] ebenso wie etwa ACTH[39] oder Penicillin[40] die Dehydrasenaktivität der Cornea, deren Aktivität übrigens durch Desoxycorticosteron[40] oder Forapin[41] gesteigert wird.

Abgesehen von ihrem Einflusse auf den pathologischen Erregungsstoffwechsel, besteht noch eine Wirkung auf den physiologischen. MJE setzt die Muskelerschlaffung bei elektrischer[3] und chemischer[31] Reizung herab. Ferner verhindert sie die Ausbreitung der Erythrophoren bei der Elritze[32]. Die Untersuchungen Lundsgaard[3] am gereizten Muskel mit MJE zeigen die Notwendigkeit eines Kohlenhydratumsatzes für den Erregungsstoffwechsel. Diese Feststellung scheint nach den erwähnten Beobachtungen allgemeinere Bedeutung zu haben.

Die Abschwächung der Gomori-Reaktion in der Cornea durch Phz stellt einen Beitrag zu dessen Wirkung als Phosphatasegift dar. Es darf bereits erwähnt werden, daß Phz ähnlich wie MJE die Entzündung beeinflußt. Damit erhebt sich die Frage, ob nicht der Hemmung der mit Oxydoreduktionen verbundenen Phosphorylierung und Dephosphorylierung eine entscheidende Rolle bei der Herabsetzung der Reaktionsfähigkeit des Mesenchyms zukomme. Offenbar erfährt der physiologische

und pathologische Erregungsstoffwechsel durch derartige Störungen beträchtliche Ausfälle an Energie. Die Muskelphysiologie gibt darüber Aufschluß[33, 34, 35, 36]. Bei der wahrscheinlichen Identität der alkalischen Gewebsphosphatase mit der alkalischen Nucleotidase und Polynucleotidase[36] ist mit einer Erweiterung des Wirkungsbereiches der MJE und des Wirkungsbereiches der MJE und des Phz zu rechnen.

Die mögliche Aktivierung der alkalischen Phosphatase der Cornea durch Hyaluronidase ließe sich mit der Rolle vereinbaren, die die Hyaluronidase bei der Entzündung[22] spielt. Sie steigert die Ausbreitungsfähigkeit pathogener Keime. Vielleicht verbindet sich mit der Erhöhung der Permeabilität und Verminderung der Viscosität[37, 38] eine Steigerung der lokalen Abwehrmechanismen, die in der erhöhten Steigerung der Aktivität energieliefernder Fermente (Phosphatase u. a.) ihren Ausdruck findet. MJE und Phz heben die Aktivierung wieder auf. Es soll weiterhin untersucht werden, ob der „spreading effect" des Fermentes durch Phosphatasegifte geändert werden kann.

Zusammenfassung.

Die an der Cornea von Kalb und Rind mit der Gomori-Reaktion durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß MJE und Phz die Glycerophosphat spaltendealkalische Phosphatase hemmen (vgl. Parnas[42]). Diese Hemmung hebt Hyaluronidase nicht auf. Es ist möglich, daß Hyaluronidase Orte mit geringer spontaner Aktivität zu solchen mit starker Fermenttätigkeit macht. Als Nebenbefund wurde die Färbung der fixen Hornhautzellen nach langer Kontaktzeit erhalten.

Literatur.

[1] Verzár u. Süllmann: Biochem. Z. **289**, 323 (1937). — [2] Verzár: Die Funktion der Nebennierenrinde, S. 70. Schwabe 1939. — [3] Lundsgaard: Biochem. Z. **264**, 209, 221 (1933); **217**, 162 (1930); **220**, 1, 8 (1930); **250**, 61 (1932). — [4] Shapiro: Biochemic. J. **41**, 151 (1947). — [5] Needham u. Pillai: Biochemic. J. **31**, 1836 (1937). — [6] Meyerhof, Ohlmeyer u. Möhle: Biochemic. J. **90**, 113, 297 (1938). — [7] Hübner u. Verzár: Helvet. chim. Acta **21**, 1006 (1938). — [8] Gomori: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **42**, 23 (1939); **67**, 4 (1948); **68**, 407 (1948); **69**, 7 (1949). — [9] Süllmann: Vit. Horm. u. Fermentforschg **8**, 1, 374 (1947). — [10] Herlant u. Timiras: Endocrinology **46**, 2, 243 (1950). — [11] Kochakian u. Bartlett: J. of Biol. Chem. **176**, 243 (1948). — [12] Gaebler u. Palm: Endocrinology **45**, 5, 480 (1949). — [13] Sherlock u. Walshe: J. of Path. **59**, 615 (1947). — [14] Köhler u. Mauer: Noch unveröffentlicht.* — [15] Ragan, Howes, Plotz, Meyer u. Blunt: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **77**, 7/8 (1949). — Bull. N. Y. Acad. Med. **26**, 251 (1950). — [16] Gross u. Meyer: Schweiz. med. Wschr. **39**, 949 (1951) (Lit.). — [17] Hench, Kendall, Slocumb u. Polley: Arch. Int. Med. **85**, 545 (1950). — [18] Cooke, Shermann, Menzel, Chapin, Howell, Scott, Myers u. Downing:

* Teilweise mitgeteilt von Köhler und Scharf, Klinische Wochenschrift **3/4**, 60 (1951).

Allergy **22**, 211 (1951). — [19] Hayano, Dorfman u. Yamada: J. of Biol. Chem. **186**, 603 (1950). — [20] Kochakian u. Robertson: J. of Biol. Chem. **190**, 481 (1950). — [21] Opsahl: Yale J. Biol. a. Med. **22**, 115 (1949). — [22] Seifter, Baeder u. Begany: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 277 (1949). — [23] Bardawill, Cornall, Nishikawara u. Wightman: Proc. 2nd Clinical ACTH-Conference, New York 1951. — [24] Köhler u. Scharf: Klin. Wschr. **3/4**, 60 (1951). — [25] Köhler u. Scharf: Med. Mschr. **2**, 113 (1951). — [26] Köhler, Scharf u. Bauer: Endokrinologie **27**, 3/4, 127 (1950). — [27] Köhler, Scharf u. Münich: Ärztl. Wschr. **43**, 854 (1950). — [28] Köhler, Bauer u. Müller: Endokrinologie **26**, 5/6, 253 (1949). — [29] Köhler, Bauer u. Müller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 214 (1951). — [30] Köhler u. Bauer: Ärztl. Wschr. **33**, 775 (1951). — [31] Bacq u. Goffart: C. r. Soc. Biol. Paris **133**, 694 (1940); **133**, 696 (1940). — [32] Köhler u. Mitarb.: Abgeschlossen. — [33] Riesser: Helvet. med. Acta **9**, 6, 720 (1942). — [34] Ingle u. Nezamis: Endocrinology **43**, 261 (1948). — [35] Ingle, Nezamis u. Rice: Endocrinology **46**, 505 (1950). — [36] Lehnartz: Chemische Physiology. 4. Aufl. Berlin. — [37] Duran-Renats: Bacter. Rev. **6**, 197 (1942). — [38] Chain u. Duthie: Brit. J. Exper. Path. **21**, 224 (1940). — [39] Köhler, Münich u. Scharf: Experientia, 1952. — [40] Köhler u. Mitarb.: abgeschl. — [41] Köhler u. Münich: abgeschl. — [42] Parnas: In Nord-Weidenhagen, Handbuch d. Enzymologie, Bd. **II**, S. 902, 1940.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 404—410 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. S. Janssen).

Die Ausschaltung des Geruchssinnes bei Dauerversuchen mit künstlichen Fetten.

Von
Alfred Enders.

(Eingegangen am 28. November 1951.)

Bei längerdauernden Stoffwechseluntersuchungen mit synthetisch hergestellten Speisefetten ergab sich folgende Schwierigkeit: die Versuchstiere lehnten die mit solchen Fetten bereitete Nahrung ab. Da die Untersuchungen von Dreyhaupt[1] gezeigt hatten, daß die synthetisch hergestellten Fette im wesentlichen nur Geruchsempfindungen auslösen, mußte der Geruchssinn ausgeschaltet werden, um die aus der Ablehnung der Nahrung entstehenden Schwierigkeiten zu beseitigen. Die dabei angewendeten Methoden und Ergebnisse sollen im folgenden geschildert werden, da ihre Anwendung in all den Fällen begründet erscheint, in denen man bei chronischen Versuchen mit Medikamenten usw. einer Nahrungsverweigerung begegnet*.

Dreyhaupt[1] hatte im Rahmen von Untersuchungen über technisch hergestellte, synthetische Speisefette gefunden, daß die überwiegende Mehrzahl der von ihm auf Geruchs- und Geschmackswirkung untersuchten Substanzen beim Menschen keine irgendwie abstoßenden Wirkungen zeigte. Der Geschmack, beziehungsweise Geruch, konnte meistens nicht sicher definiert werden. Er wurde von den Versuchspersonen als leicht „talgartig", „fettig", „nußartig" usw. bezeichnet.

Weitere Untersuchungen von Dreyhaupt bewiesen, daß es sich bei diesen Sinnesempfindungen ausschließlich um Geruchs- und nicht um Geschmacksempfindungen handelte. Denn bei angelegter Nasenklemme wurde übereinstimmend von sämtlichen Versuchspersonen kein „Geschmack" mehr wahrgenommen. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen. Da der Geschmackssinn nur durch Stoffe gereizt wird, die in Wasser gelöst an die Papillen gebracht werden, konnten die lipoidlöslichen Kunstfette Sinnesempfindungen nur durch Reizung des Geruchssinns auslösen. Da es sich bei diesen Kunstfetten nicht um chemische Reinsubstanzen, sondern um technische Produkte handelte, kamen als Ursache für diese Reizung des Geruchssinns auch Verunreinigungen, anomale Oxydationsprodukte unbekannter Art usw. in Frage.

Bei den Versuchen von Dreyhaupt[1] hatten die Versuchspersonen stets nur wenige Tropfen des betreffenden Kunstfettes, mit mehr oder weniger Paraffinum liquidum vermischt, zu sich genommen. In Selbstversuchen, die zur Klärung des Dicarbonsäurestoffwechsels nach Genuß von Kunstfetten dienten, nahm Baier[2] 30 g als Brotaufstrich zu sich. In diesen Mengen erregte zwar ein Teil der Kunstfette

* Über die Chemie und die Biologie der untersuchten synthetischen Fette soll anderenorts berichtet werden. In dieser Arbeit werden sie nur als Testsubstanzen bei der Anwendung der geschilderten Methodik angeführt.

einen gewissen Widerwillen, irgendwelche ausgeprägte subjektive oder objektive Nachteile ließen sich jedoch bei diesen wochenlang durchgeführten Versuchen nicht feststellen.

Um so erstaunlicher war die von uns festgestellte Abneigung von Versuchstieren gegen längeren Genuß einer Nahrung, die mit Kunstfett zubereitet worden war. Dabei zeigten sich Hunde besonders empfindlich. In einem Fall wurde mit Kunstfett versetzter Mehlbrei auch nach 7tägigem Hunger hartnäckig zurückgewiesen. Wurde dieser Brei am 7. Tage durch einen völlig gleichartigen, aber mit Schweinefett zubereiteten Brei ersetzt, dann fraß der Hund diesen sofort.

Um trotzdem chronische Versuche durchführen zu können, bei denen die Versuchstiere das künstliche Fett auf natürlichem Wege, d. h. mit der Nahrung zu sich nehmen sollten, wählten wir zunächst *Hühner als Versuchstiere*, weil diese Vögel Mikrosmaten sind, d. h. wenig oder gar nicht riechen können[3]. Diese wurden einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten und der tägliche Futterverbrauch gewogen. Die Hühner erhielten ein zu kleinen Krumen zermahlenes Brot, dessen Zusammensetzung ich anderenorts angegeben habe[4]. Zunächst wurde 5 Tage ein Brot verfüttert, das mit natürlichem Fett zubereitet war. Dann wurde dieses Brot durch ein Futter ersetzt, das an Stelle des natürlichen Fetts Kunstfett enthielt. Dabei ergab sich ein Futterverbrauch, wie er in Tab. 1 dargestellt ist.

Tabelle 1.

Huhn Nr. 1. Futterverbrauch in g/Tag.

Versuchstag 1— 5: Futter mit natürlichem Fett.
Versuchstag 6— 8: Futter mit künstlichem Fett.
Versuchstag 9—10: Futter mit natürlichem Fett.

Versuchstag:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Futterverbrauch in g:	72	84	76	76	79	34	46	41	93	78

Versuche mit 5 anderen Hühnern ergaben dasselbe Bild. Aus diesen Versuchen folgte, daß das mit Kunstfett zubereitete Brot zwar nicht völlig abgelehnt wurde, daß aber doch nur etwa halb so viel wie bei Darreichung normalen Futters verzehrt wurde. Somit entsprach dieses Ergebnis nicht unseren Erwartungen, die von der Ansicht ausgegangen waren, daß der Geruch der Kunstfette die Ablehnung des Futters durch die Versuchstiere hervorruft, wenn er auch menschliche Versuchspersonen wenig oder gar nicht stört. Wir nahmen daher zunächst an, daß der Geruchssinn der Hühner doch besser entwickelt ist, zumal neuere Untersuchungen von Wagner[5] über die Sinnesphysiologie der Vögel in diese Richtung weisen.

Weiter wurde versucht, den Hinweis von Fröhlich[6] auszunutzen, daß Atropin den Geruchssinn durch die Sekretionsbeschränkung ausschaltet. Wir stellten zunächst fest, daß 2 unserer Versuchshunde ein bestimmtes Kunstfett, Nr. 53, völlig ablehnten. Beide Tiere erhielten dann täglich einen Brei, der neben Kartoffelstärke und Trockenmilch 30 g Schweinefett enthielt. Bei dieser Kost zeigten beide Tiere Gewichtskonstanz. Das Futter wurde täglich um dieselbe Zeit verabreicht und von beiden Tieren rasch und vollständig gefressen. Wurden aber die 30 g Schweinefett durch Kunstfett 53 ersetzt, dann lehnte Versuchshund 1 seine Portion sofort ganz ab, während Tier 2 beim ersten Mal noch ein bis zwei Probebissen nahm, sich dann aber ebenfalls weigerte, noch etwas zu sich zu nehmen.

Beiden Tieren wurde darauf mehrfach eine halbe Stunde vor der Fütterung Atropin injiziert und zwar in Dosen von 0,1 mg bis 10,0 mg pro Kilogramm. Dabei

schieden größere Mengen als 10 mg von vorneherein aus, da die durch sie hervorgerufene Allgemeinvergiftung dazu führte, daß die Tiere auch normales Futter nicht mehr erkannten und nicht fraßen. Die kleineren Dosen hatten aber ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg: auch durch Anwendung von Atropin und die durch dieses Alkaloid bezweckte Schädigung des Geruchsinns gelang es nicht, die Hunde zum Fressen des einmal von ihnen abgelehnten Kunstfettes zu bewegen.

Zur Kontrolle dieses Ergebnisses wäre es erwünscht gewesen, andere Substanzen zu finden, die mit Sicherheit infolge ihres schlechten Geruchs den Hunden zuwider sind. Wäre das Futter nach Zusatz dieser Stoffe abgelehnt worden, nach Atropinanwendung aber gefressen worden, dann wäre unsere Ansicht widerlegt gewesen, daß die Ablehnung des mit Kunstfett zubereiteten Breis auf dessen schlechten Geruch beruhe. Trotz Prüfung zahlreicher hier in Frage kommender Substanzen konnte jedoch kein Geruchsstoff gefunden werden, der unseren Versuchshunden so zuwider gewesen wäre, daß er zur Nahrungsverweigerung geführt hätte. Von derart geprüften Substanzen seien genannt: Tinkt. asa foetida, alkoholischer Auszug von Rattenfaeces und Tabakabsud, der nach Moleschott[7] normalen Hunden „ein Greuel" ist. Auch wenn größere Mengen dieser Stoffe dem Futter zugegeben wurden, fraßen die Hunde ihren Brei ebenso rasch wie sonst.

Somit hatten diese Versuche weder einen Weg ergeben, mit Kunstfett zubereitete Nahrung längere Zeit zu verfüttern, noch auf der anderen Seite einen Gegenbeweis zu unserer Ansicht geliefert, daß die Ablehnung des Kunstfetts auf einem den Hunden zuwideren Geruch beruht.

Es wurde daher versucht, den Geruchssinn bei Hunden operativ auszuschalten. Der scheinbar einfachere Weg, das Fett durch die Schlundsonde zu verabreichen und dadurch eine längerdauernde Applizierung zu ermöglichen, verbot sich aus zwei Gründen: Erstens neigen Hunde nach Anwendung der Schlundsonde zu Erbrechen. Zweitens hätten die Fette dann nicht mit den anderen Nahrungsmitteln zusammen verabreicht werden können und es hätten sich keine physiologischen Resorptionsverhältnisse erzielen lassen. Wegen des feinen Geruchsvermögens der Hunde war es auch nicht angängig, den fraglichen unangenehmen Geruchsstoff durch andere, dem Hunde angenehme Substanzen zu überdecken. Entsprechende Versuche mit Fleischbrühe usw. verliefen resultatlos, wie nach der Literatur[8] zu erwarten gewesen war.

Bei der *operativen Ausschaltung des Geruchssinns* wurde von einer Verödung des Geruchsepithels abgesehen. Einmal sind die anatomischen Verhältnisse in der vielfach gebuchteten Nasenhöhle des Hundes zu unübersichtlich, als daß man mit Sicherheit eine durchgängige Zerstörung des Sinnesepithels hätte erreichen können. Außerdem vermag sich das Riechepithel nach Zerstörung weitgehend zu regenerieren[9]. Wir versuchten daher, den Geruchssinn durch Abtrennung oder Exstirpation des Lobus olfactorius auszuschalten. Da dieser kein peripherer Nerv ist, sondern als intracerebrale Bahn angesprochen werden muß, findet nach Durchtrennung desselben keine Regeneration statt[10]. In beiden Fällen war also ein Dauererfolg zu erwarten.

Zwecks sinnesphysiologischer Untersuchungen durchschnitt bereits MOLESCHOTT[7] 1859 bei säugenden Hunden den Riechlappen vom eröffneten Stirnbein her. Die so operierten Tiere verirrten sich im Stall und fanden die mütterlichen Zitzen nicht mehr, obwohl die Operation als solche gut überstanden wurde. Weiter wurde der Tractus olfactorius von W. ALLEN[11] zum Studium der Atemreflexe durchschnitten. Diese bisherigen Ergebnisse sprachen für eine Anwendung der Operation bei unserer Fragestellung.

Das operative Vorgehen richtete sich nach den bei Hirnoperationen allgemein angewendeten Verfahren. Als Versuchstiere wurden Hunde gewählt, da deren Verhalten gegenüber den synthetischen Fetten bereits aus den vorhergehenden Versuchen ausreichend bekannt war. Die Tiere erhielten am Vortag der Operation nichts zu fressen, 1 Std vorher 5 mg Morphin/kg sowie 1 mg Atropin s. c. injiziert. Zur eigentlichen Narkose verwendeten wir Chloralose, 80 mg/kg. Um eine Abschwellung und Härtung des Gehirns zu erzielen, wurde vor der Operation noch 1 cm^3 gesättigter Kochsalzlösung pro kg Tier i. v. injiziert. Ferner wurden während der Operation, zur Einschränkung der Blutungsneigung, beide Carotiden temporär abgebunden. — Nach Durchtrennung der Kopfhaut und Abpräparieren der Muskulatur wurde auf beiden Seiten, etwa 1—2 cm von der Medianen entfernt, die Schädelkapsel trepaniert. Die Trepanationsöffnung wurde dann mit der Knochenzange erweitert, bis die Abgrenzung von Bulbus olfactorius und Stirnlappen deutlich zu erkennen war. Bei 4 Hunden wurde dann an der Grenze beide Hirnteile frontal durchschnitten. Bei 2 Hunden wurde der gesamte Bulbus olfactorius entfernt. Dabei entstehende Blutungen konnten fast immer durch Kochsalztampons zum Stehen gebracht werden. Da bei diesem Vorgehen stets die Nasennebenhöhlen, soweit sie die das Riechhirn enthaltende Schädelhöhle umschließen, eröffnet wurden, führten sekundäre Nachblutungen meist nicht zu Hirndruckerscheinungen, sondern das mit Liquor vermischte Blut tropfte ein bis zwei Tage durch die Nase ab. Nur in einem Fall kam es durch Hirndruck zum Tode, das Tier starb 3 Tage nach der Operation an epileptiformen Krämpfen. Die Sektion zeigte umfangreiche Nachblutungen. — Nach Schließen der Wunde erhielten die Tiere zum mechanischen Schutz einen Stärkeverband. Alle Tiere waren am nächsten Tag bereits wieder munter und wohlauf. Sie fanden aber ihr Fressen nicht, die Nahrung mußte ihnen ins Maul geschoben werden und wurde dann erst gefressen. Erst im Verlauf von einigen Tagen gewöhnten sich die Tiere wieder an selbständiges Fressen aus dem Futternapf. Dabei handelte es sich natürlich nicht um eine Wiederherstellung des Geruchssinns, wie aus der nachfolgenden Schilderung entsprechender Kontrollversuche hervorgeht, sondern um die Ausbildung des Erkennens der Nahrung mittels des Gesichtssinns.

Bevor wir Kunstfette an diese Tiere verfütterten, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, die den Verlust des Riechvermögens sichern sollten. Dem betreffenden

Hund wurde nach 24stündigem Hungern ein Stück Holz und ein Stück Lunge vorgelegt, die beide in Papier eingewickelt waren. Es wurde darauf geachtet, daß weder das Holz noch das zu seiner Umhüllung verwendete Papier mit der Lunge in Berührung gekommen waren. Ein normaler, hungriger Hund stürzt sich sofort auf das Papierpäckchen mit der Lunge, benagt es, öffnet es und frißt die Lunge. Das andere Päckchen wird von einem normalen Hund kaum beachtet. Der operierte Hund dagegen interessiert sich für keines der beiden Päckchen. Erst wenn man das Lungenstückchen mit seiner Schnauze oder Zunge in Berührung bringt, schnappt er gierig zu und frißt es auf. Dieser Versuch konnte nicht beliebig oft mit dem gleichen Erfolg wiederholt werden, da der Hund bald lernte, daß in den Päckchen etwas Eßbares war. Er benagte sie dann auch, aber nach der Methode von Versuch und Irrtum, nicht zielbewußt wie ein Tier mit normalem Geruchsvermögen.

Diese Vorversuche wurden in ähnlicher Weise mit allen operierten Hunden durchgeführt, bevor die Versuche mit Kunstfett an ihnen vorgenommen wurden.

Hierbei erhielten die Tiere mehrere Wochen einen Nahrungsbrei der oben geschilderten Zusammensetzung, zunächst nur natürliches Fett enthaltend. Die Futtermenge wurde so gewählt, daß das Körpergewicht konstant blieb und daß das Futter stets sofort nach der Darreichung ganz gefressen wurde. Ein normaler Hund diente als Kontrolltier. Nach dieser Vorperiode wurde das natürliche Fett in diesem Brei durch Kunstfett ersetzt.

Dabei zeigte sich, daß jetzt das mit Kunstfett zubereitete Futter von den operierten Hunden sofort ganz aufgefressen wurde, während der normale Kontrollhund diesen Brei meist schon am ersten Tage, sonst stets am zweiten Tage ganz ablehnte. Die Tiere mit ausgeschaltetem Geruchssinn fraßen den mit Kunstfett zubereiteten Brei 3—5 Tage lang. Weitere Versuche zeigten aber, daß die operierten Tiere das mit Kunstfett zubereitete Futter doch nicht, wie erwartet, in demselben Maße fraßen, wie normale Tiere den mit natürlichem Fett zubereiteten Brei. Wenn nämlich normalen Hunden, die auf obige Weise in ein Körpergleichgewicht gebracht worden waren, die doppelte Portion des gewohnten Futters gereicht wurde, dann wurde auch diese sofort gefressen, da die Tiere zwar ausreichend, aber doch knapp ernährt waren. Erhielten Hunde mit ausgeschaltetem Geruchsvermögen die doppelte Menge des sonst verabreichten Kunstfettbreis, dann fraßen sie diese zögernd, in einzelnen Fällen nur wenig mehr als die Hälfte.

Die operierten Tiere 6 und 7 erhielten ferner mit Kunstfett zubereitetes Futter länger als 8 Tage. Diese Tiere fraßen den Brei erst zögernder, dann ähnlich wie der normale Kontrollhund überhaupt nicht mehr. Wenn die Hunde in diesem Stadium 1—2 Tage gehungert hatten — durch Ablehnen des mit Kunstfett zubereiteten Futters —, wurde ihnen wieder ein Brei gereicht, der mit natürlichem Fett zubereitet war. Diese Hunde fraßen dann auch diesen Brei nicht mehr, nahmen aber Futter ganz anderer Konsistenz und anderen Aussehens, wie etwa Lungenstücke, gierig zu sich.

Diskussion.

Obwohl an Hunden die operative Ausschaltung des Geruchssinns gelungen war, fraßen diese Tiere doch nicht in demselben Maße mit Kunstfett zubereitetes Futter wie normale Hunde Futter mit natürlichem Fett. Immerhin ließ sich ein deutlicher Unterschied im Verhalten feststellen: die operierten Tiere lehnten Kunstfett erst nach wesentlich länger dauernder Verfütterung ab, als dies an normalen Hunden zu beobachten gewesen war.

Auch fraßen sie wesentlich größere Mengen als die normalen Hunde. Als Ursache der noch bestehenden, wenn auch geringeren Abneigung gegen das Kunstfett käme zweierlei in Betracht: Erstens könnten die auch an menschlichen Versuchspersonen festgestellten (1, 2), subjektiv unangenehmen Empfindungen vom Hund wesentlich stärker wahrgenommen werden. Zu diesen Empfindungen gehören etwa Kratzen im Hals, Brechreiz usw. Zweitens ist zu berücksichtigen, daß bei Hunden auch der nicht mit ausgeschaltete Geschmacksinn viel feiner als beim Menschen entwickelt ist.

Bemerkenswert ist weiter, daß die Hunde, die ihres Geruchssinns beraubt sind, auch normales Futter ablehnen, wenn sie sich an dem mit Kunstfett versetztem Brei „überfressen" haben. Diese Erscheinung wurde an normalen Hunden nie beobachtet. Hunde ohne Geruchsvermögen können aber beide Futterarten nicht unterscheiden, zur Erkennung des Futters müssen sie den Gesichtssinn und Tastsinn benutzen. Für diese beiden Sinnesqualitäten besteht aber kein Unterschied zwischen den beiden Breiarten, und so lehnen Hunde ohne Geruchsvermögen nach einiger Zeit den Brei ganz ab, nicht aber Futter, das sich, wie Lungenstücke, auch für die anderen Sinne deutlich von dem allmählich unangenehm gewordenen Brei unterscheidet.

Es ist anzunehmen, daß sich bei normalen Hunden ein bedingter Reflex zwischen dem an sich nicht unangenehmen, aber spezifischen Geruch des Kunstfettes und gewissen unlustbetonten Sensationen nach dessen Genuß ausbildet. Dieser Reflex führt sekundär zur Ablehnung des kunstfetthaltigen Futters. Bei Hunden ohne Geruchsvermögen bildet sich ein solcher Reflex unspezifischer Art aus, der die Ablehnung jeder Art von Brei bewirkt.

Auf welche Substanzen im einzelnen die Ablehnung des mit Kunstfett zubereiteten Futters beruht, wurde durch diese Untersuchungen nicht aufgeklärt. Vermutlich handelte es sich nicht um die technisch hergestellten Triglyceride selbst, sondern um Verunreinigungsprodukte, die bei der technischen Synthese, unter anderen durch anomale Oxydation der Paraffine, mit anfallen.

Zusammenfassung.

1. Bei Hunden wurde durch Abtrennung oder Exstirpation des Lobus olfactorius das Geruchsvermögen ausgeschaltet.

2. Diese Tiere fraßen Futter, das mit synthetischen Fetten verschiedener Art vermengt war, in größeren Mengen und längere Zeit, als normale Kontrolltiere, die derartiges Futter in der Mehrzahl der Versuche völlig ablehnten.

Literatur.

[1] Dreyhaupt, G.: Dissertation. Freiburg/Bg, 1941. — [2] Baier, W.: Dissertation. Freiburg/Bg, 1941. — [3] Henning: Der Geruch. Leipzig: Ambr. Barth. — [4] Enders, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 606 (1942). — [5] Wagner, H. O.: J. of Ornithol. **87**, 1 (1939). — [6] Zitiert nach E. v. Skramlik: Physiologie der niederen Sinne, 1926. — [7] Moleschott: Untersuchungen zur Naturlehre, S. 254 (1859). — [8] Lit. bei W. v. Buddenbrock: Grundriß der vergleichenden Physiologie, 1937. — [9] Schultz, E. W.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **46**, 41 (1941). — [10] Handbuch der Neurologie Bd. 1, 1113 und V, 24. — [11] Allen, W.: Amer. J. Physiol. **115**, 579 (1936).

Dozent Dr. Alfred Enders, Freiburg i. Br., Pharmakol. Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 411—415 (1952).

Über eine dosisabhängige paradoxe Wirkung des α-Tocopherols (Vitamins E) auf die Diurese*.

Von

H. Becker-Freyseng.

(Eingegangen am 3. Dezember 1951.)

Dem Vitamin E begegnet steigendes klinisches Interesse, besonders seitdem das Bemühen einsetzte, der Vielzahl seiner Auswirkungen einen übergeordneten Angriffspunkt zugrunde zu legen, nämlich denjenigen auf die Hypophyse (Verzár, Heinsen 3,6).

Die Antithese dieser Theorie sieht die E-Wirkungen charakterisiert durch die gemeinsamen Beziehungen zu „mesenchymalen Krankheiten" und postuliert für die Stoffwechseländerungen nach Vit. E eine pharmako-dynamische Erklärung (Markees). Ihren derzeitigen Abschluß hat die Einfluß-Sphäre des Vit. E über den schon sehr weit gesteckten Rahmen (Keimdrüsen-, Stoffwechsel- und Wasserhaushaltsstörungen, Muskeldystrophie, Herz- und Gefäßleiden, Hautkrankheiten, Paradentose, Otosklerose, Netzhauterkrankungen, Eklampsie, Hypertonie, Rheuma) hinaus durch ihre Verbindung zur Nebennierenrinde (Athanassiu), speziell dem Cortison (Heinsen und Köker) und zu carzinogenen Substanzen aus dem gestörten Cholesterinabbau (Roy) gefunden.

In dieser Situation, wo „die Verwirrung über die biologische Bedeutung und den therapeutischen Wert" des Vit. E so groß ist wie für kein anderes Vitamin (Markees), dürften klinische Beobachtungen, wonach *verschiedene Dosen* synthetischen α-Tocopherol-Acetats (Evion**) beim gleichen Patienten und unabhängig von der Gesamtdosis *entgegengesetzte Wirkungen* entfalten können, von grundsätzlicher Bedeutung sein.

Über die Beziehungen des Vit. E zum Wasserhaushalt, auf den sich meine Untersuchungen zunächst beschränken, liegen bereits tierexperimentelle (Bird u. Mitarb., Dam u. Mitarb., Lang und Ranke, Pappenheimer, Stepp u. Mitarb.) und klinische Angaben vor. Heinsen, dem wir besonders eingehende Untersuchungen des Stoffwechsels unter Vit. E verdanken (1—8), sah bei Gesunden nach 8—10 Tagen und 60 mg Vit. E täglich Diuresesteigerung (2,5), bei hypophysär-diencephal (h. d.) Erkrankten Normalisierung sowohl der pathologisch gesteigerten wie verminderten Ausscheidung (Heinsen 6, Heinsen und v. Massenbach). In langfristigen Versuchen (9—15 Wochen) kam es zum Teil nach dem primären Anstieg zur Diuresehemmung, die Heinsen (2,5) als Bremsung des Hypophysenvorderlappens durch die vermehrt abgesonderten Sexualhormone oder als Erschöpfung der Hypophyse ansieht.

Gegenüber diesen langdauernden Untersuchungen soll hier an wenigen Beispielen über Beobachtungen berichtet werden, die mittels des Volhardschen Wasserversuchs (V.W.) unmittelbar nach einmaliger i.m. Injektion von Vit. E gewonnen wurden.

---

* Vgl. auch Klin. Wschr. 1951, S. 649.

** Der Firma E. Merck danke ich ergebenst für freundliche Überlassung des Präparates.

Bekanntlich läßt sich durch Hypophysenvorderlappenhormon sowohl bei Gesunden als auch besonders bei h.d.-Oligurie eine Diuresesteigerung erzielen (Curschmann), während umgekehrt mit Hypophysenhinterlappenextrakt je nach Ausgangslage des h.d.-Systems mehr oder weniger starke Diuresehemmung eintritt (Damm, Feuchtinger, Marx). Von diesen Befunden und der Hypophysenwirkung des Vit. E ausgehend, gaben wir dieses Vitamin bei Patienten mit h.d.-Oligurie. Bei Ausschluß einer renalen Störung ist für eine h.d.-Oligurie der Hypophysin-Wasserversuch (V.W. mit 3 V.E. Hypophysin) mit einer 4-Std-Ausscheidung unter 600 cm³ beweisend (Damm, Marx), besonders mit Halbstundenportionen unter 100 cm³ in den ersten 2 Std.

Ohne der Analyse unserer Fälle in Verbindung mit der reichhaltigen neueren Literatur (Feuchtinger; Jores; Sturm) vorzugreifen, sei nur darauf hingewiesen, daß Veil bereits 1922 die „primäre Oligurie" als „nicht seltenes Symptom bei cerebralem Insult" beschrieb, daß in dem von E. u. J. Frey geschilderten Fall von h.d.-Oligurie eine Gehirnerschütterung Jahre vorausgegangen war, und daß auch die zwei ausgesprochensten Fälle unserer Beobachtung vor Jahren Schädeltraumen erlitten hatten.

Von dem einen dieser beiden Kranken (K. Bö.) gibt Tab. 1 die Ausscheidungswerte nach 1500 cm³ leicht gesüßten, sehr dünnen Tees in den ersten 4 Std unter den verschiedenen Bedingungen wieder.

Tabelle 1. Volhard*scher Wasserversuch nach 1500 cm³ Tee (Pat. K. Bö.).*

Std	Einf. Wasserversuch		3 V.E. Hypophysin		1,0 Präphyson		Evion 1,0		Evion 2,0	
	cm³-Menge	spez. Gew.	cm³-Menge	spez. Gew.	cm³-Menge	spez. Gew.	cm³-Menge	spez. Gew.	cm³-Menge	spez. Gew.
½	117	1,024	90	1,025	110	1,021	135	1,022	95	1,020
1	47	1,011	19	1,014	135	1,001	260	1,001	155	1,000
1½	95	1,005	15	1,015	240	1,000	335	1,000	275	1,000
2	91	1,005	16	1,012	140	1,001	390	1,000	265	1,000
2½	59	1,007	16	1,018	140	1,002	160	1,005	170	1,000
3	40	1,008	23	1,015	57	1,005	75	1,005	76	1,003
3½	27	1,016	30	1,012	45	1,006	80	1,015	45	1,008
4	27	1,016	19	1,015	—	—	50	1,018	40	1,006
Ges.	449		228		867		1485		1121	

Neben der ungenügenden Ausscheidung und ungenügenden Konzentration im einfachen V.W. und dem eindeutigen Ergebnis des Hypophysin-V.W. sei besonders darauf hingewiesen, daß die diuretische Wirkung von 30 mg α-Tocopherolacetat (= 1,0 Evion i.m.) diejenige von 1,0 Präphyson erheblich übertrifft; ebenso verhält sich die Wirkung auf die Konzentrationsfähigkeit. *Um so überraschender ist der Rückgang der Diurese unter der doppelten Menge* Evion auf 1121 cm³ unter geringer Dissoziation von Ausscheidung und spezifischem Gewicht in den zwei

letzten Portionen. Die diuresefördernde Wirkung des Vit. E fanden wir in anderen Fällen bestätigt, von denen wir als Beispiel folgende 4-Std-Werte anführen: Einfacher V.W. 786 cm³, unter 3 V.E. Hypophysin 303 cm³, unter 1,0 Evion 998 cm³ (Pat. P. Ka.).

Aber auch die *paradoxe Wirkung* des Vit. E auf die Diurese konnten wir wiederholt feststellen. Im Selbstversuch betrug die unbeeinflußte 4-Std-Menge nach 1500 cm³ Tee einmal 1160 cm³, ein zweites Mal 1165 cm³; nach 2,0 Evion schied ich 800 cm³ aus, nach 1,0 Evion (43 Tage später) 1314 cm³. Den *stärksten paradoxen Vit.-E-Effekt* wies ein Kollege (Dr. M. Schm.) ebenfalls im Selbstversuch auf:

Tabelle 2. Volhard*scher Wasserversuch nach 1500 cm³ Tee (Dr. M. Schm.).*

Std	1,0 Evion i. m.		Einfacher V.W.		2,0 Evion i.m.	
	Menge	spez. Gew.	Menge	spez. Gew.	Menge	spez. Gew.
½	50 cm³	1,022	60 cm³	1,025	59 cm³	1,022
1	95 cm³	1,007	200 cm³	1,000	—	—
1½	320 cm³	1,000	325 cm³	1,000	—	—
2	225 cm³	1,000	165 cm³	1,001	30 cm³	1,018
2½	35 cm³	1,004	65 cm³	1,004	18 cm³	1,021
3	45 cm³	1,006	39 cm³	1,006	—	—
3½	50 cm³	1,005	27 cm³	1,012	16 cm³	1,033
4	90 cm³	1,003	17 cm³	1,015	—	—
Gesamt-menge	910 cm³		898 cm³		123 cm³	

In diesem Fall hielt die Diuresehemmung nach 2,0 Evion noch die folgenden 10 Std unvermindert an. Trotz Flüssigkeitszufuhr wurden vom Ende des Wasserversuchs um 12 bis 22 Uhr nur 130 cm³ Urin abgegeben. Gleichzeitig bestanden starke Kopfschmerzen, wohl als Ausdruck einer Gehirnschwellung (Oberdisse). Am nächsten Tag stellte sich (ohne eine überschießende Nachphase) normale Ausscheidung ein. Während im eigenen Selbstversuch zuerst die größere Menge Evion zur Anwendung kam, gingen wir im Fall M. Schm. umgekehrt vor, um eine gegenseitige Beeinflussung der ersten und zweiten Dosis auszuschließen. Im Fall Dr. M. Schm. lagen zwischen den zwei Untersuchungen 49 Tage. In beiden Fällen hatte unabhängig von der Reihenfolge die Dosis von 2,0 Evion den hemmenden Einfluß.

Während in diesen Fällen bereits im einfachen V.W. eine erniedrigte Diurese bestand, fanden wir bei *normaler Diurese* den paradoxen Vit.-E-Effekt bei Verdoppelung der Dosis *nicht*. Die 4-Std-Werte betrugen z. B. im einfachen V.W. 1252 cm³, nach 1,0 Evion 1263 cm³ und nach 2,0 Evion 1426 cm³. Ohne eine — wenn auch noch so leichte — h.d.-Störung des Wasserhaushalts scheint also Vit. E bei einmaliger Zufuhr erst bei höherer Dosis diuretisch zu wirken.

Im Gegensatz zu Markees, der an Ratten keine diuretische Wirkung des Vit. E fand, bestätigen die mitgeteilten Beispiele grundsätzlich die Befunde Heinsens bezüglich der Diurese. Darüber hinaus aber beweisen sie wenigstens für den Wasserhaushalt die *Wirksamkeit einmaliger parenteraler Zufuhr relativ kleiner Vit.-E-Mengen.* Bormann und Heinsen nahmen an, „daß Vit. E anscheinend erst bei einer gewissen Dosierung wirkt und in kurzfristigen Versuchen nach einmaliger parenteraler Gabe keinen Effekt auf den Stoffwechsel zeigt".

Zur Erklärung des dosisabhängigen paradoxen Effektes des Vit. E sei an die von der h.d.- bzw. hormonalen Ausgangslage abhängige Wirkung des Vit. E erinnert: Gewichtsverlust bei Fettsucht (Heinsen 6), Gewichtszunahme bei Thyreotoxikose (Heinsen 1) und bei entwicklungsgehemmten Kindern (J. Frey); fördernde oder hemmende Wirkung auf die Diurese (Heinsen 2, 5); noch unveröffentlichte eigene Untersuchungen zusammen mit R. Clotten machen auch für die Ausscheidung der C-17-Retosteroide eine Abhängigkeit von der hormonalen Grundlage wahrscheinlich. Demgegenüber zeigen die hier mitgeteilten Befunde meines Wissens zum erstenmal die fördernde *und* hemmende Wirkung beim gleichen Menschen in *Abhängigkeit von der einmaligen Dosis.* Ein Hinweis auf den paradoxen Thyroxin-Effekt auf die Diurese, von dem Damm annimmt, daß er auf einer sofortigen Gegenregulation des h.d.-Systems und vermehrter Adiuretin-Ausscheidung beruht, liegt deshalb nahe, weil an diesem zentralen System wahrscheinlich das Vit. E angreift. Nach den klinischen Erfahrungen ist für Vit. E eine enge Beziehung zu der von Bargmann und Hild sowie von Ortmann entdeckten Gomori-Substanz als der im Hypothalamus gebildeten proteinolipoiden Trägersubstanz des Adiuretins (vgl. auch Sturm) zu vermuten. Der Verbindungsweg Vit. E-Hypophyse-Nebennierenrinde läßt auch an Verhältnisse wie bei der Überdosierung von Nebennierenrindenhormon denken, wobei Tonutti allgemeines Anasarka und Lungenödem sah, und nachdem ja die wasserretinierende Wirkung des Desoxycorticosterons bekannt ist.

Die Bedeutung dieses mit allem Vorbehalt vorläufig mitgeteilten paradoxen Vit.-E-Effektes scheint mir zunächst in folgenden Punkten zu liegen: Hier könnte der Schlüssel zum Verständnis liegen für die unterschiedlichen therapeutischen Erfolge, z. B. allein auf dem Gebiet der Herzbehandlung (Baer, Heine und Gelford; Butturini; Levy und Boas). Weiterhin dürfte eine Überprüfung der völlig verschiedenen Dosierung, vor allem aber der im Vergleich zu unseren durchaus wirksamen Mengen von 30 bzw. 60 mg als Riesendosen zu bezeichnenden Einzelgaben von 400—600 mg bei der Kreislaufbehandlung (Baer u. Mitarb.; Butturini), von 300—1200 mg zur Anregung der Nebennierenrindenfunktion (Heinsen und Kröker) und 2000 mg bei der Behandlung von Hautleiden (Burges), angezeigt sein!

Schließlich dürften obige Befunde eine Erweiterung der bisherigen Theorie Heinsens (2) nötig machen, wonach „für die normale Funktion des Hypophysenvorderlappens die Anwesenheit einer ausreichenden Menge von Vit. E notwendig zu sein scheint" und Regulationsstörungen der Hypophysenfunktion auf Grund von E-Mangel aus exogenen und endokrinen Ursachen durch die vermehrte Zufuhr von Vit. E behoben werden. Denn der paradoxe Vit.-E-Effekt kann nicht mehr

mit dem Ausgleich eines Mangels erklärt werden, ebensowenig wie mit einer Hypervitaminose, wie sie für die Wirkungsumkehr bei langer Zufuhr diskutiert wird (Heinsen und v. Massenbach).

Zusammenfassung.

Die von Heinsen zuerst beschriebene Wirksamkeit des Vit. E auf die Diurese wird grundsätzlich bestätigt. Über die bisherigen Befunde hinaus aber beweisen die mitgeteilten Beobachtungen die volle Wirksamkeit einmaliger parenteraler Vit.-E-Zufuhr auf den Wasserhaushalt. Bei Kranken mit hypophysär-diencephaler Oligurie tritt nach einmaliger parenteraler Zufuhr von 30 mg α-Tocopherol-Acetat (= 1,0 Evion) eine Diurese ein, die diejenige nach Hypophysen-Vorderlappenhormon (1,0 Präphyson) erheblich übertrifft. Bei denselben Patienten kann aber die *doppelte Vit.-E-Menge zu einer ausgesprochenen Diuresehemmung führen.* Dieser bisher nicht bekannte *dosisabhängige paradoxe Vit.-E-Effekt* kann nicht mehr mit einem einfachen Ausgleich eines Vit.-E-Mangels als der Ursache von hypophysären Regulationsstörungen erklärt werden und zwingt deshalb zu einer Erweiterung der bisherigen Theorie der Vit.-E-Wirkung.

Literatur.

Athanassiu, G.: Med. Mschr. **2**, 186 (1948). — Baer, S., W. J. Heine and D. B. Gelford: Amer. J. Med. Sci. **215**, 542 (1948); Ref. Dtsch. med. Wschr. **1948**, 576. — Bargmann, W.: Klin. Wschr. **1949**, 27. — Bargmann, W., u. W. Hild: Acta Anat. **8**, 264 (1949). — Bird, Culton u. Kline, zit. nach Stepp u. Mitarb.: l. c. pag. 355ff. — Bormann, P., u. H. A. Heinsen: Dtsch. Arch. klin. Med. **193**, 157 (1948). — Burges, J. F.: Lancet **250/IV**, 215 (1948); Ref. Dtsch. med. Wschr. **1948**, 660. — Butturini, U.: Giorn. Clin. med. **31**, 1 (1950); Ref. Dtsch. med. Wschr. **1950**, 339. — Curschmann, H., zit. nach Jores: : l. c., pag. 120. — Dam u. Glawind, zit. nach Stepp u. Mitarb.: l. c., pag. 355ff. — Damm, G.: Dtsch. med. Wschr. **1949**, 1000; **1950**, 1016. — Feuchtinger: Med. Klin. **1946**, 5; **1947**, 2 u. 48. — Frey, J.: Klin. Wschr. **1949**, 348. — Frey, E., u. J. Frey: Die Funktionen der gesunden und kranken Niere. Springer 1950. — Heinsen, H. A.: Med. Klin. **1947**, 823. — Dtsch. med. Wschr. **1948**, 410; **1949**, 149, 988. — Dtsch. Z. Verdauungs- u. Stoffwechselkrkh. **9**, 28 (1949). — Dtsch. Arch. klin. Med. **194**, 236 (1949). — Med. Klin. **1950**, 254. — Dtsch. med. Wschr. **1951**, 73. — Heinsen, H. A., u. H. Köker: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 487. — Heinsen, H. H., u. R. v. Massenbach: Klin. Wschr. **1949**, 126. — Jores, A.: Klinische Endokrinologie, 3. Aufl. Springer 1949. — Lang, K., u. O. F. Ranke: Stoffwechsel u. Ernährung. Springer 1950. — Levy, H., and E. P. Boas: Ann. int. Med. **28**, 1117 (1948). — Markees, S.: Internat. Z. Vitaminforschg **22**, 335 (1950) (Übersicht!). — Marx, H.: Monographien Physiol. **33** (1933). — Oberdisse: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 253. — Ortmann, R.: Klin. Wschr. **1950**, 449. — Pappenheimer, zit. nach Stepp u. Mitarb.: l. c., pag. 355ff. — Roy, A. B.: Schweiz. med. Wschr. **1950**, 1030. — Stepp, W., J. Kühnau u. H. Schröder: Die Vitamine, 6. Aufl. Stuttgart: F. Enke 1944. — Sturm, A.: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 449. — Tonutti, E.: Klin. Wschr. **1949**, 569. — Veil, W. H.: Dtsch. Arch. klin. Med. **139**, 192 (1922). — Veil, W. H., u. A. Sturm: Die Pathologie des Stammhirns. Jena: G. Fischer 1942. — Verzár, F.: Pflügers Arch. **227**, 511 (1931).

Dr. H. Becker-Freyseng, Heidelberg, Neckarstaden 16.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 416—422 (1952).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. L. Heilmeyer).

Über Wirkungen von adrenotropem Hypophysenvorderlappenhormon, 11-Dehydro- und 11-Desoxy-Corticosteron im Modellversuch am Tier.

Von
Ludwig Heilmeyer, Joachim Frey und Richard Fischer.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Dezember 1951.)

Die Bedeutung einzelner Nebennierenrindenhormone für die Prägung der verschiedensten Krankheitsbilder wurde in letzter Zeit vielfach auseinandergesetzt (Selye[1], Kendall[2], Thorn[3], Tonutti[4], Heilmeyer[5], Frey[6], Beiglböck, Hoff und Clotten[7] u. a.).

Noch stärker ist die Bedeutung von NNR-Hormonen durch die Konzeption Selyes von den „Adaptationskrankheiten" in den Vordergrund gerückt worden. Es sind dies einesteils das von ihm als entzündungssteigernd angesehene 11-Desoxycorticosteron (Compound Q von Reichstein, DOC) und das bekanntlich entzündungshemmend wirkende 17-Hydroxy-11-dehydro-corticosteron (Compound E von Kendall, Cortison), das eine allgemeine Bremsung des Mesenchyms hervorruft (Studer[8] u. a.); dazugehörig sind zu nennen das Trophin des letztgenannten Hormons, das adrenotrope Hormon der Prähypophyse (ACTH, das die Cortisonausschüttung aus der NNR stimuliert) und weiterhin nach Selye[1, 9] ein Symplex (ACTH + Faktor x, angeblich das Wachstumshormon[10]), der die NNR zur DOC-Abgabe veranlassen soll. Gegenüber dieser dualistisch-antagonistischen Anschauung von den NNR-Hormonen steht Verzár[11], der die Bedeutung beider genannten Hormone als Faktor für die Phosphorylierung sieht; Long und Lukens[12] suchen den Schwerpunkt der ACTH-Wirkung in einer Umwandlung von Aminosäuren in Kohlenhydrate.

In Verbindung mit den Untersuchungen der Wirkung des Thiosemicarbazonderivats TBI (Conteben Bayer[13]) und der Anwendung der aufgeführten Hormone in der Klinik war es von Wichtigkeit, den Effekt der letztgenannten Stoffe am Modell der Eiweißhyperergie der Ratte näher zu untersuchen.

Die Methode der Auslösung einer angeborenen hyperergischen Hautreaktion auf Hühnereiereiweiß bei der Ratte[14] wurde in einer vorausgegangenen Arbeit geschildert[13] (intraperitoneale Injektion von 0,5 ml Ovalbumin). Bei 97 normalen und 26 adrenalektomierten Kontrollen wurden 103 nicht adrenalektomierte und 101 adrenalektomierte Ratten mit einem Gewicht von 50—60 g zu den Hormonversuchen herangezogen.

Ergebnisse.

1. Gegenüber Kontrollen beeinflußt DOC (DOCA öllöslich als Percorten Ciba und Cortiron Schering und DOC-glucosid als Percortenhydrosolubile Ciba) in einer Dosis von 1—4 mg s.c. oder i.v. die Eiweißhyperergie im Durchschnitt nicht[15] (Abb. 1), jedoch kommt es in manchen Fällen zur Ödemverstärkung wie zur Schwellungsverminderung

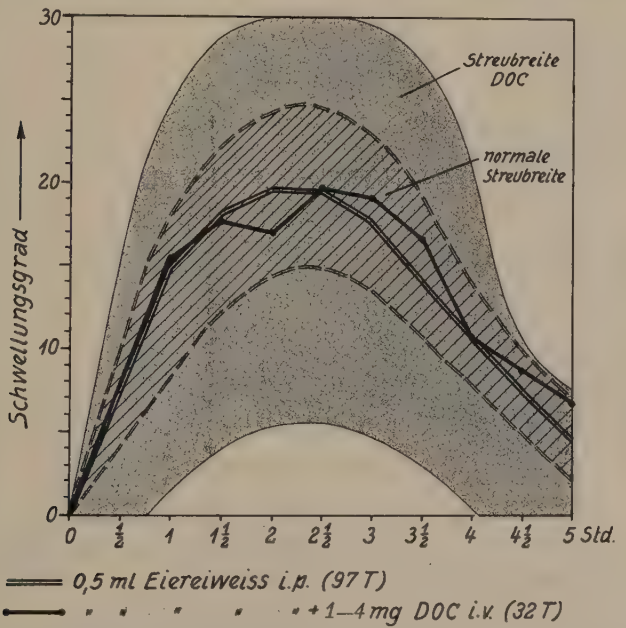


Abb. 1. Durchschnittlich gleichstarke Entwicklung der Ovalbuminhyperergie an der Rattenhaut ohne und mit Zugabe von DOC (mittlere Kurven). Gegenüber der Streubreite der Kontrollen ohne DOC (schraffierter Bereich) ist derjenige mit DOC größer (dunkel getönter Bereich): Desoxycorticosteronzugaben führen in einzelnen Fällen zu stärkerer Vermehrung sowie Verminderung der hyperergischen Hauterscheinungen.

in einem Streubereich, der größer als der nur mit Ovalbumin allein behandelten Tiere gefunden wurde. Die Abweichung dieses Befundes von dem Selyes[1], der nach DOCA stets eine Schwellungszunahme sah, mag an der von uns verwandten Hormonmenge liegen, die nicht übergroß gewählt wurde.

2. Gibt man zum Eiweiß 0,5 mg ACTH (Hoechst) s.c., so verringert sich die Ausbildung der Hauthyperergie; der gleiche Befund tritt nach 1—2 mg Cortison (Ciba) s.c. ein, ebenso bei gleichzeitiger Verabfolgung von ACTH + Cortison (Abb. 2). Fügt man noch 1—2 mg DOC-glucosid zu ACTH oder Cortison, so resultiert aus diesen Kombinationen durchschnittlich keine wesentliche Verstärkung der hyperergischen

Hauterscheinungen[15], wenn auch gelegentliche Intensivierungen (bei ACTH + DOC) wie auch Besserungen des Schwellungsgrades gesehen wurden (Abb. 3). Diese Beobachtung ist für eine DOCA-Therapie wichtig[16].

3. Läßt man 0,5 mg ACTH s.c. auf adrenalektomierte Tiere einwirken, so ist die Schwellungsintensität nur gering verändert im Vergleich zu derjenigen der Kontrollen mit Erhaltung der suprarenalen

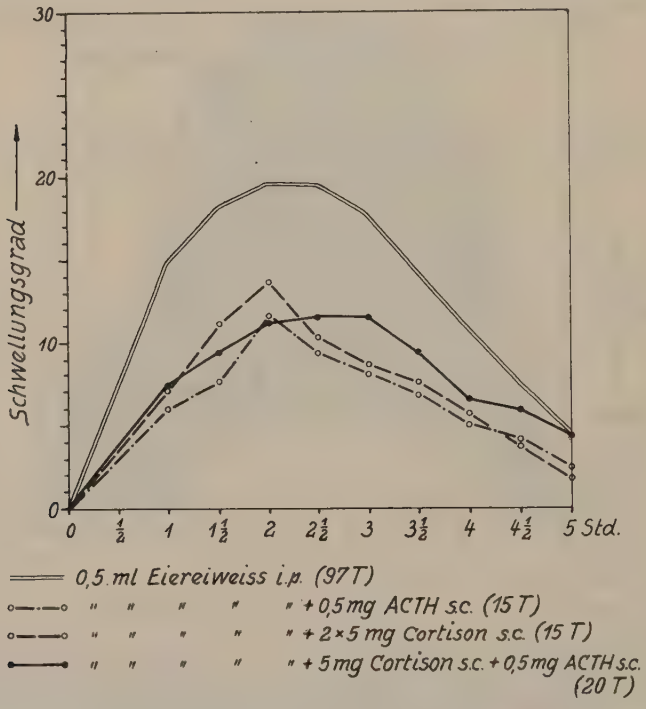


Abb. 2. ACTH und Cortison verkleinern die Hauthyperergie nach intraperitonealen Ovalbumingaben.

Hormonorgane: ACTH bewirkt demnach die bekannte Ausschüttung von entzündungshemmendem Cortison (Abb. 4a). Cortisongabe (5 mg s.c.) dagegen läßt bei adrenalektomierten Tieren eine gleichstarke Hintanhaltung der Hyperergie in Erscheinung treten wie bei intakten NN (Abb. 4b).

4. Interessant ist noch der Vergleich der Hyperergiestärke bei adrenalektomierten Ratten ohne und mit Zusatz von DOC. Die ödematösen Hauterscheinungen sind bei adrenalektomierten Tieren etwas stärker als bei solchen mit erhaltenen NN und dauern ebenfalls länger an, wie das auch bei lokaler Ovalbuminapplikation in die Pfote beobachtet wurde[17]. Das mag in einer ACTH-Cortison-Ausschüttung infolge

der Ovalbumineinverleibung und der Ausbildung ihrer Folgen (Eiweißödem) begründet sein, da die Cortisonausstoßung auf den Stress jetzt

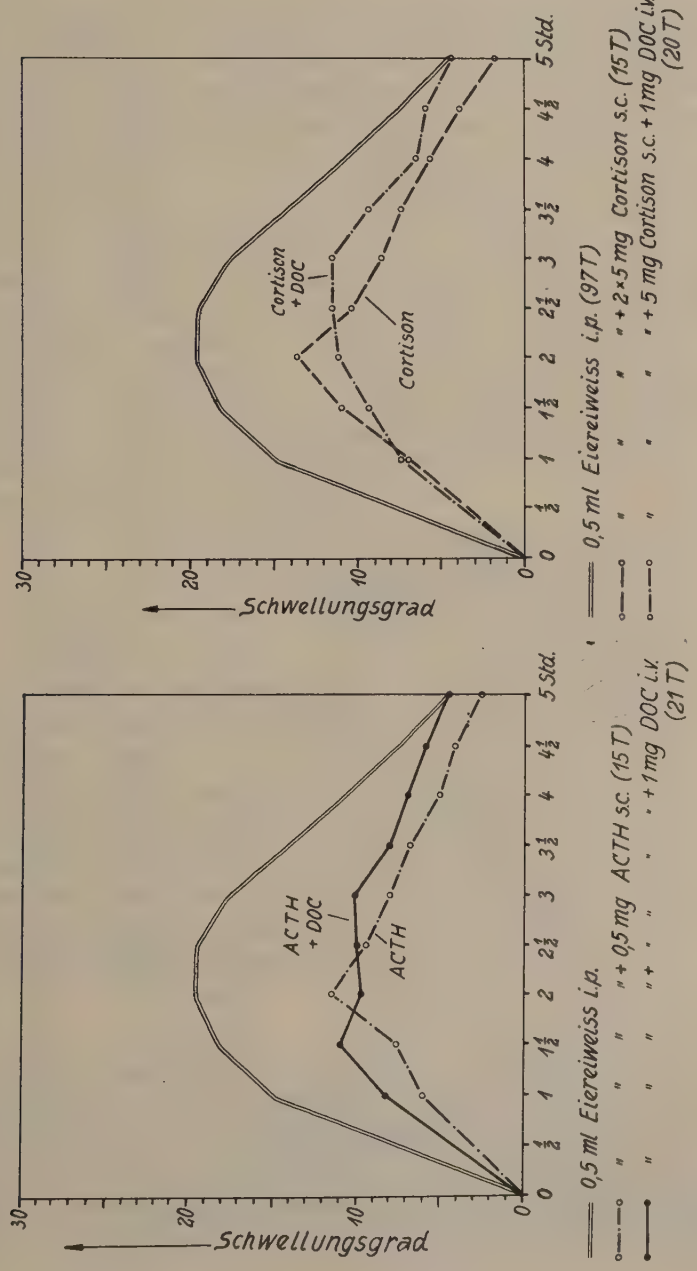


Abb. 3. Gleichstarke Bremsung der Ödementwicklung nach Eiereiweiß durch ACTH und Cortison ohne und mit Hinzufügung von DOC.

in Wegfall kommt. — Gibt man adrenalektomierten Tieren (48 Versuche) zum Ovalbumin zusätzlich DOCA + ACTH, so ist jetzt die

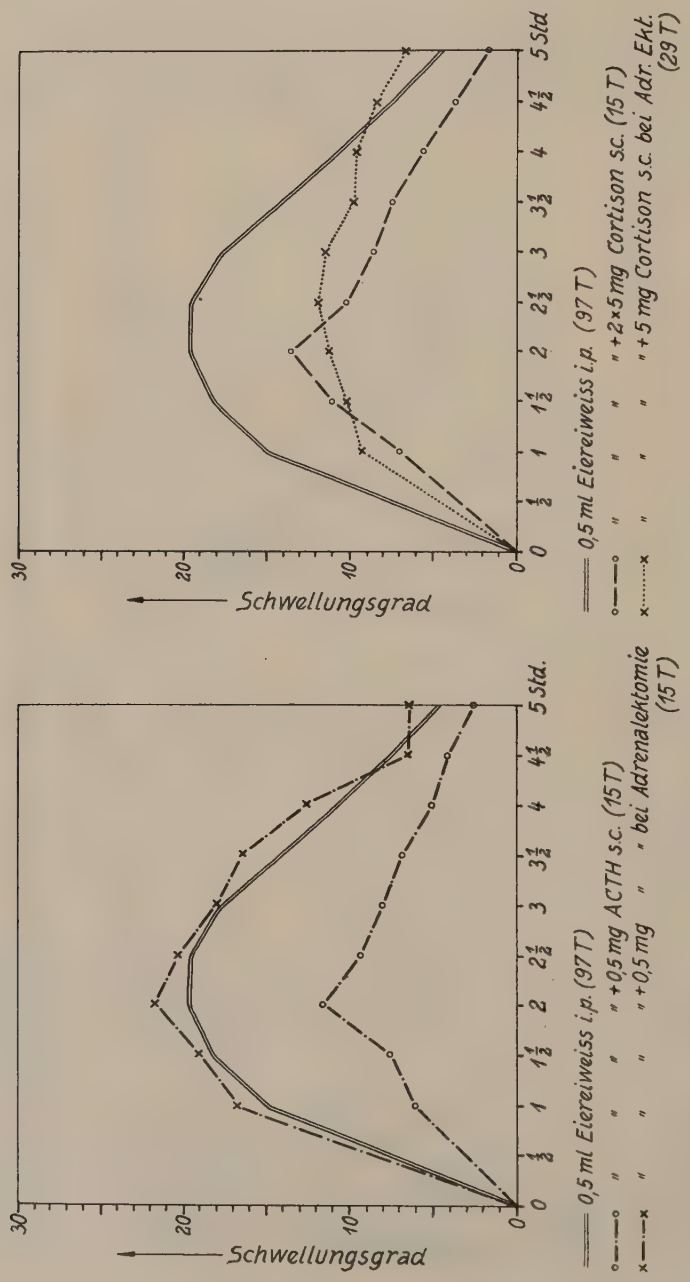


Abb. 4. Adrenalektomie hebt die bremsende ACTH-Wirkung auf (4a), läßt die Cortisonwirkung dagegen unbeeinflußt (4b).

Stärke des Eiweißödems durchschnittlich vergrößert und kann in einzelnen Versuchsserien eine Steigerung bis zu 25% über den Schwellungsgrad der Kontrollen mit erhaltenen NN erreichen. Spritzt man jedoch nebennierenlosen Ratten DOCA allein, so wird eine leichte Reduzierung der Hauterscheinungen deutlich (nach 2½ Std maximal durchschnittlich 18,5 Schwellungsgrade, gegenüber 21—22 bei Adrenalektomie ohne DOC oder 20 bei unbeeinflußten Kontrollen). Man kann demnach dem DOC eine alleinige entzündungssteigernde Wirkung nicht zusprechen, wie es SELYE[1] tut. Zu gleichem Resultat kamen MEIER, GROSS und DESAULLES[19]. Die einzelnen Bedingungen liegen hierbei viel verwickelter[15] und lassen sich offenbar nicht in ein einfaches Schema[1] bringen. — Für die Klinik dürften diese Beobachtungen hinsichtlich einer DOCA-Therapie[16] von Bedeutung sein, indem es von der Leistungsfähigkeit der Prähypophyse (auch in der Lieferung noch anderer Substanzen als dem ACTH, siehe nachfolgende Mitteilung von FREY und FISCHER), derjenigen der Nebennierenrinde und schließlich der Ansprechbarkeit der Gewebe auf die Hormone und Trophine abhängt, in welcher Weise das Entzündungsgeschehen abläuft[15] (siehe dazu auch WEISSBECKER und HEILMEYER[18]).

Zusammenfassung.

Am Modell der Ovalbuminhyperergie der Ratte wird gezeigt, daß

1. ACTH und Cortison die bekannte Verkleinerung einer „entzündlichen" Reaktion bewirken,

2. Adrenalektomie ACTH-Gaben wirkungslos macht, nicht den Effekt von Cortison,

3. DOC bei erhaltenen Nebennieren im Durchschnitt keine Ödemverstärkungen bedingt und

4. Eiweißinjektionen mit ihren Folgen offenbar eine ACTH-Cortison-Ausstoßung veranlassen.

5. Einige Einzelbefunde werden außerdem mitgeteilt; es wird auf ihre Erklärung kurz eingegangen.

Literatur.

[1] SELYE: Stress, Acta, Inc. Montral, Canada: Medical Publ. 1950. — [2] HENCH, KENDALL, SLOCUMB and POLLEY: Proc. Staff Med. Mayo Clin. **24**, 181 (1949). — SPRAGUE, POWER, MASON, ALBERTH, MATHIESON, HENCH, KENDALL, SLOCUMB and POLLEY: Arch. int. Med. **85**, 200 (1950). — [3] THORN, FORSHAM, FRAWLEY, HILL, ROCHE, STAELEIN and WILSON: New England J. Med. **242**, 783. 824, 865 (1950). — [4] TONUTTI: Neue med. Welt **1950**, 111. — [5] HEILMEYER: Klin. Wschr. **1950**, 254. — [6] FREY, J., in E. u. J. FREY: Die Funktionen der gesunden und kranken Niere. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — In HEILMEYER:

Lehrb. d. Pathol. Physiol. Jena: Fischer 1951. — Krankheiten der Nieren und der Harnwege. München 1951. — [7] Beiglböck, Hoff u. Clotten: Zur Frage der Cortisonwirkung. Augsburg 1950. — [8] Studer: Vortrag in Medizin. Ges. Freiburg 1951. — [9] Selye: Brit. Med. J. **1950**, 1383. — [10] Selye: Lancet CCLX (1951/I), 6653, 483. — [11] Verzár: Schweiz. med. Wschr. **1950**, 468. — [12] Long and Lukens, zit. nach Beiglböck, Hoff u. Clotten. — [13] Heilmeyer, Frey u. Fischer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 387 (1951). — [14] Selye: Endocrinology **21**, 169 (1937). — [15] Frey u. Fischer: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **57**, 69 (1951). — [16] Frey: Ärztl. Wschr. **1948**, 486. — [17] Wilhelmi u. Domenjoz: Arzneim. Forsch. **1**, 151 (1951), dort weit. Lit. — [18] Weissbecker u. Heilmeyer: Münch. med. Wschr. **1951**, 676. — [19] Meier, Gross u. Desaulles: Klin. Wschr. **1951**, 653.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 423—426 (1952).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. Ludwig Heilmeyer).

Der Einfluß von Hypophysenvorderlappenextrakten auf die Eiweißhyperergie der Ratte im Vergleich zu dem von ACTH und Cortison.

Von
Joachim Frey und Richard Fischer.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Dezember 1951.)

Nach Differenzierung der Wirkungsweisen von ACTH, Cortison, DOC[1, 2] sowie von TBI (Conteben Bayer)[3] erhob sich als weitere Frage, ob Hypophysenvorderlappenpräparate die durch Eiereiweiß erzeugten hyperergischen Erscheinungen an der Haut der Ratte[4] beeinflussen können. Angeregt waren diese Untersuchungen von der Annahme Selyes[5], daß adrenocorticotropes Hormon (ACTH) + Faktor x (beide aus der Prähypophyse) eine DOC-Ausstoßung der NNR verursache; der genannte Faktor im lyophilisierten Hypophysenvorderlappenpräparat sei möglicherweise das Wachstumshormon des HVL[6].

Verwandt wurden Präphyson „Promonta" (0,3 Frischorgan in 1 ml), Preloban „Bayer" (25 Reifungseinheiten in 1 ml) und Hypophysenvorderlappenextrakt „Henning" (aus 0,5 g HVL in 1 ml). Als Hinterlappenpräparat diente Hypophysin „Bayer" (3 Vögtlin-Einheiten in 1 ml). — Die Dosierungen der HVL-Präparate bei 50—60 g schweren Ratten, die 0,5 ml natives Hühnereieiweiß intraperitoneal erhielten[3], entsprachen $^1/_{1000}$ einer üblichen menschlichen Dosis (subcutane Injektionen). Vom Hypophysin wurde 0,001 V.E. pro Gramm Ratte s.c. gegeben. — Neben 104 Kontrollen wurden an unoperierten Tieren für die HVL-Präparate 142, für das HHL-Präparat 14 sowie 73 adrenalektomierte Ratten verwandt.

Tabelle 1.

Hypophysenextrakte	Tierzahl	Dosis pro Tier	Hauthyperergie nach Ovalbumin: durchschnittl. Schwellungsgrade[3], erreicht nach St.								
			1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
HVL											
Präphyson Promonta . .	31	0,001—0,05 ml	6	7	8	7	5	5	5	4	4
Preloban Bayer	25	0,001 ml	6	9	8	8	7	7	5	4	3
HVL Henning	22	0,001—0,005 ml	6	7	9	9	10	9	8	6	3
Kontrollen	89		15	18	20	19	18	15	11	8	5
HHL											
Hypophysin Bayer . . .	14	0,001 V.E. pro g	5	12	14	14	12	8	6	5	4

Ergebnisse.

1. Durch Verabfolgung von HVL-Präparaten ist gegenüber Kontrollen eine starke Reduzierung der aus Ovalbumin-Injektionen induzierten Hauthyperergie der Ratte eingetreten (Tab. 1); auch HHL verringert etwas den hyperergischen Schwellungsgrad, was auf Beimengungen von HVL zurückgeführt werden könnte.

Tabelle 2.

	Durchschnittsgewichte		
	pro Tier g	pro Vorderpfote mg	pro Hinterpfote mg
15 Kontrollen	54	940 ($\varepsilon = \pm 29$)	940 ($\varepsilon = \pm 19$)
15 Präphyson-Ratten.	54	770 ($\varepsilon = \pm 32$)	760 ($\varepsilon = \pm 25$)

Die Beurteilung des Schwellungsgrades geschah durch Schätzung; aber auch bei Wägung der 2 Std nach Ovalbumingabe abgetrennten Extremitäten, an denen die Eiweißödeme üblicherweise stark ausgeprägt sind, läßt sich an diesem Modell der gleiche „entzündungshemmende" Effekt (nach Präphysonanwendung) erkennen (Tab. 2), wobei der

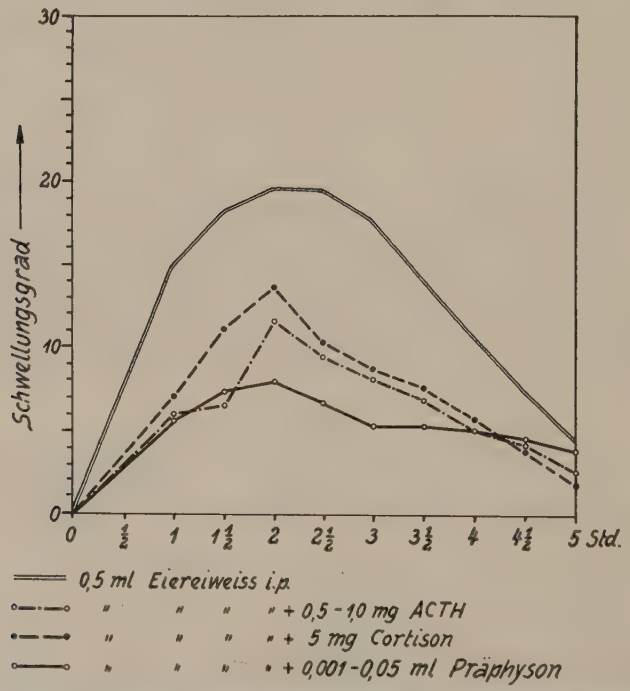


Abb. 1. Einwirkung von Hypophysenvorderlappenextrakten (hier Präphyson), von adrenotropem HVL-Hormon (ACTH) und 11-Dehydro-17-hydroxycorticosteron der Nebennierenrinde (Cortison) auf die hyperergische Hautreaktion der Ratte durch Eiereiweiß: gleichstarker entzündungswidriger Einfluß von HVL-Extrakt wie von ACTH oder Cortison.

Unterschied statistisch gesichert ist (signifikante Differenz für Vorderbeine 3,7 und Hinterbeine 5,3).

2. Bei einem Vergleich mit ACTH- (Hoechst) und Cortison- (Ciba-) Gaben[1] ist die Wirkung der HVL-Extrakte etwa gleich (Abb. 1). Gibt man zum HVL-Präparat zusätzlich noch DOCA (1—4 mg s.c., 43 Tiere), so ist die Präphysonhemmung der hyperergischen Hauterscheinungen

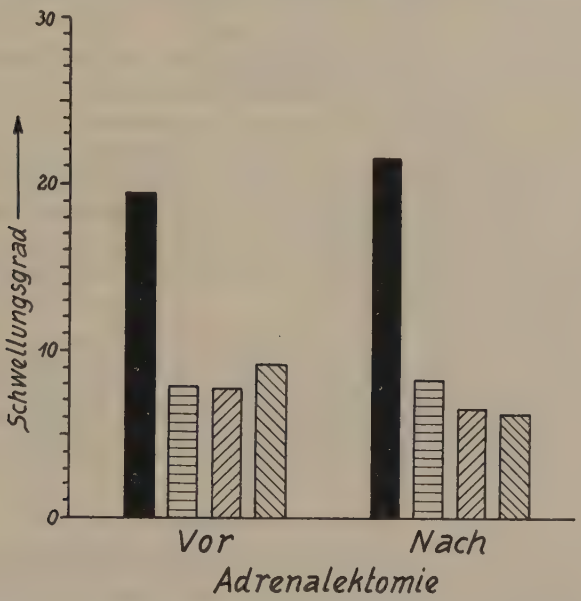


Abb. 2. Schwellungsgrad der Rattenhaut (Extremitäten, Schnauze, Genitale usw.) 2 Std nach Ovalbumin-Injektion bei Tieren mit erhaltenen (linker Abbildungsteil) und entfernten (rechter Abbildungsteil) Nebennieren (schwarze Säulen) und Verabfolgung von HVL-Präparaten Präphyson, Preloban und HVL-Henning (schraffierte Säulen): die hyperergiehemmende Wirkung der HVL-Extrakte bleibt nach Adrenalektomie in gleicher Stärke erhalten.

modifiziert, nämlich in dem Sinne, daß eine Ödemverstärkung[5] zustande kommt: nach 2 Std ist der durchschnittliche Schwellungsgrad von 8,0 auf 13,4 erhöht; diese Steigerung liegt aber noch unter dem üblichen Wert der Kontrollen von 20 (siehe Tab. 1), so daß die Präphysonhemmung — wenn auch vermindert — erhalten bleibt. — Die kombinierte Verabfolgung von Präphyson und ACTH (0,001 ml Präphyson + 0,5 mg ACTH s.c. bei 6 Tieren) läßt jedoch nicht erkennen, daß im Präphyson der Faktor x von Selye[5] in bedeutsamer Menge enthalten sei und im Verein mit ACTH eine Hyperergieverstärkung bewirke.

3. Die von Heilmeyer[7] aufgefundene entzündungshemmende Wirkung des TBI, die auch ohne Mitwirkung der NNR zustande kommt[3], verstärkt ebenfalls den bremsenden HVL-Einfluß (Präphyson), ähnlich

wie auch die ACTH- und Cortison-Wirkung durch TBI intensiviert werden kann, was ebenfalls durch das Modell der Eiweißhyperergie der Ratte aufgezeigt[3] wurde.

4. Gibt man adrenalektomierten Tieren HVL-Extrakte, so bleibt deren Wirkung auf die durch Ovalbumin hervorgerufene Hauthyperergie erhalten: die ödematösen Schwellungen sind signifikant verringert (Abb. 2). Die in den Extrakten enthaltenen Stoffe regen also nicht (wie ACTH) die NNR zur Cortisonausschüttung an, sondern wirken offenbar ohne Nebennierenrindenbeteiligung unmittelbar auf das Gewebe ein und hemmen eine hyperergisch verlaufende Reaktion auf Eiereiweiß. Daß diese Stoffe, die demnach nicht mit ACTH identisch sein dürften, bei den Auswirkungen von Hypophysentransplantationen ebenfalls mitbeteiligt sein können, sei bemerkt (siehe hierzu Beiglböck, Hoff und Clotten[8]). Die Zugabe von DOCA zu mit Präphyson behandelten adrenalektomierten Ratten (40 Tiere) verstärkt die hyperergischen Erscheinungen nicht signifikant, wie es bei den Tieren mit erhaltenen NN der Fall war (Ziffer 2).

Die Annahme von zahlreichen in der Prähypophyse gefundenen Stoffen läßt eine ebensolche Zahl von möglichen Deutungen für die hier mitgeteilten Befunde zu. Ob es sich um sogenannte Somatotrophine (STH), das Evanssche Wachstumshormon oder um andere Faktoren handelt, soll mit den entsprechenden HVL-Extrakten bei Hypophysektomie von uns dem Versuch einer Differenzierung zugeführt werden.

Zusammenfassung.

Die Anwendung von Hypophysenvorderlappenpräparaten bei der Eiweißhyperergie der Ratte zeigt einen starken hemmenden Einfluß auf die Schwellungsstärke der Haut, der als direkte Wirkung auf die Gewebe aufgefaßt werden muß, da er nach Adrenalektomie in gleichem Ausmaß erhalten bleibt und demnach keinen ACTH-Cortison-Mechanismus darstellt.

Literatur.

[1] Heilmeyer, Frey u. Fischer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 416 (1952). — [2] Frey u. Fischer: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **57**, 69 (1951). — [3] Heilmeyer, Frey u. Fischer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 387 (1951). — [4] Selye: Endocrinology **21**, 169 (1937). — [5] Selye: Stress, Acta, Inc. Montreal, Canada: Medical Publishers 1950. — [6] Selye: Lancet CCLX (1951/I), 6653, 483; Ref. in Dtsch. med. Wschr. **1951**, 624. — [7] Heilmeyer: Klin. Wschr. **1948**, 649; **1950**, 254. — [8] Beiglböck, Hoff u. Clotten: Zur Frage der Cortisonwirkung. Augsburg 1950.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 427—432 (1952).

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. Berthold Mueller).

Zur Frage der Relation von Blutalkohol zum Atemalkohol.

Von
P. Seifert.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. November 1951.)

Mit dem in diesem Archiv früher beschriebenen Prinzip der Atemalkoholbestimmung haben wir weitere zahlreiche Untersuchungen angestellt und Erfahrungen gesammelt. Unsere Bemühungen waren vor allem darauf abgestellt, genauere Beziehungen zwischen Blutalkohol und Atemalkohol zu finden.

Die Apparatur wurde nicht verändert, bis auf die Bestimmung der geatmeten Luftmenge, die nicht mehr mit dem Spirometer, sondern mit einer Gasuhr der Fa. Elster & Co. A.-G., Mainz, abgelesen wurde. Dies hat den Vorteil der genauen Ablesung. Es wurde außerdem dazu übergegangen, nicht nur 15 min bis zur ersten Bestimmung zu warten, um den Mundalkohol auszuschalten, sondern es wurde zusätzlich der Mund bis zum Beginn der Bestimmung mehrmals mit Wasser gespült, wodurch eine sichere Vermeidung von Fehlern durch Mundalkohol möglich ist. Vor jeder Versuchsreihe wurde eine Waschflasche mit einer 1- oder 2‰igen Alkohollösung vorgeschaltet und die Luftmenge gemessen, die durchgeblasen werden mußte, bis der Umschlag erfolgte. Auf diese Weise wurden Apparatur und Reagenzien einer dauernden Kontrolle unterworfen. Es wurde auch häufiger eine Leeruntersuchung eingeschoben, bei der eine Person, die nicht unter Alkohol stand, zum Atmen in die Apparatur veranlaßt wurde. Bei einwandfreiem Arbeiten der Apparatur werden bis zum Auftreten der ersten Farbänderung des Reagenses im Leerversuch über 20 Ltr. Luft geatmet. Der Verbindungsschlauch zwischen Absorptionsgefäß und Mundstück wurde nach je 2—3 Versuchen mit Wasser durchgespült, um Fehler durch eventuell kondensierten Alkohol auszuschließen.

Für die Versuche standen insgesamt 6 Versuchspersonen, zumeist Studenten, zur Verfügung. Zuerst wurden Nüchternversuche mit mindestens 6stündiger vorheriger Nüchternheit und 24stündiger Alkoholkarenz durchgeführt. Dann wurden Nahrungsmittelbelastungen mit Nahrungsmitteln verschiedener Mengen und Zusammensetzung unter gleichen Bedingungen zum Zweck der Ermittlung der quantitativen Beeinflussung der Alkoholresorption vorgenommen.

Getrunken wurde 30%iger Alkohol, und zwar in jedem Versuch die gleiche relative Alkoholmenge, nämlich 0,8 g/kg Körpergewicht, in der kürzest möglichen Zeit, durchschnittlich 3—5 min. Um den Höhepunkt der Resorptionskurven möglichst genau zu erfassen, wurden (mittels Capillaren) im Gegensatz zur früheren Praxis Blutproben in Intervallen von je 3—5 min entnommen, auch die Atemproben in kurzen Zeitabständen von etwa 5 min durchgeführt. Verdächtige Werte

wurden sofort durch eine Kontrollbestimmung überprüft. Nach jeder Atemprobe wurde das Reaktionsgefäß mit Aqua dest. durchgespült, und in Abständen von 15—20 min auch das zuleitende Schlauchstück.

Insgesamt wurden 17 Trinkversuche angestellt*. Die im Folgenden wiedergegebenen Kurvenbilder der Versuche 1, 7 und 17 charakterisieren die Verhältnisse bei den reinen Alkoholversuchen, während die der Versuche 4, 8 und 9 den Einfluß der gleichzeitigen Nahrungszufuhr erkennen lassen.

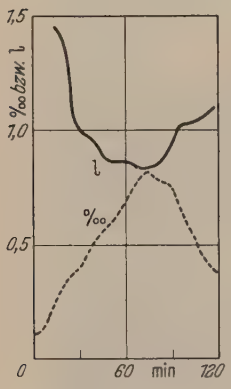


Abb. 1.

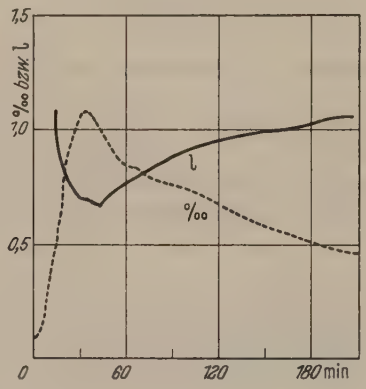


Abb. 2.

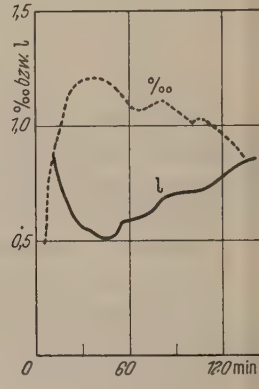


Abb. 3.

Abb. 1—3. Nüchtern-Alkohol-Versuche 1, 7 und 17
4 6. Alkohol-Nahrungsbelastungs-Versuche 4, 8 und 9 } Stets 0,8 g/kg Alkohol getrunken.

Abb. 1. Versuch 1: 24stündige Alkohol-Karenz, 17 Std nüchtern.
Abb. 2. Versuch 7: 24stündige Alkohol-Karenz, 6 Std nüchtern.
Abb. 3. Versuch 17: 24stündige Alkohol-Karenz, 14 Std nüchtern.

Durch die verschiedenen Nahrungsbelastungen kommt es zu einer Mannigfaltigkeit des Verlaufes der einzelnen Blutalkoholkurven und der zugehörigen Atemkurven. Trotz dieser Verschiedenheit im Verlauf der Kurven der einzelnen Versuche wird das reziproke Verhalten von Blutalkohol- zur Atemluftkurve deutlich. Dem Ansteigen der Blutalkoholkurve entspricht immer ein Abfallen der Atemkurve und umgekehrt. Das Resorptionsmaximum wird in allen Versuchen bei beiden Kurven im ungefähr gleichen Zeitraum angezeigt. Die maximale Verschiebung beträgt hierbei 10—15 min. Die Schnittpunkte der Blutalkohol- und Atemkurven liegen auch hier alle in der Höhe von 0,8—0,9% Blutalkohol bzw. 0,8—0,9 Liter Atemluft. Änderungen der Blutalkoholkurven im auf- und absteigenden Ast sowie in bezug auf die Maxima

* Für die Gewinnung der Atemalkohol-Kurven vgl. auch Dr.-Dissertation von E. Bulmahn, für die zugehörigen Blutalkohol-Kurven die von W. Graefe. Daselbst ausführliche Daten und Kurven. Beiden Herren sei für ihre wertvolle Mitarbeit an dieser Stelle herzlich gedankt.

durch Änderung der Versuchsbedingungen kommen auch in der Atemalkoholkurve zum Ausdruck. Die quantitative Relation zwischen Atem- und Blutalkohol ist demnach als praktisch unbeeinflußbar durch Versuchsbedingungen anzusehen, die eine Änderung der Blutalkoholkurve

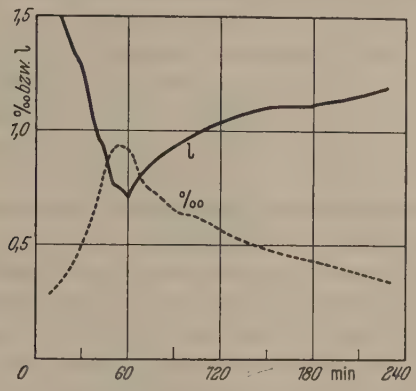


Abb. 4. Versuch 4: 24stündige Alkohol-Karenz, 13 Std nüchtern. 110 cm³ reines Olivenöl mit einer halben Scheibe Brot in 20 min. Nach 45 min Alkohol-Zufuhr in 3 min.

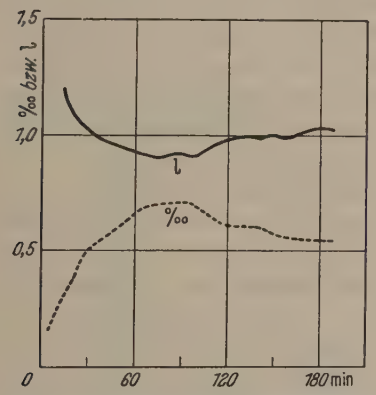


Abb. 5. Versuch 8: 24stündige Alkohol-Karenz. 6½ Std nüchtern. 250 g Schichtkäse in 10 min. Alkohol-Zufuhr nach 30 min in 5 min.

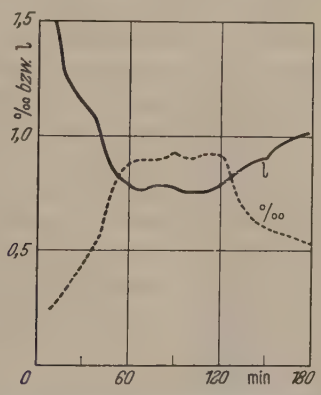


Abb. 6. Versuch 9: 24stündige Alkohol-Karenz, 6 Std nüchtern. 450 g Kartoffelbrei in 15 min. Alkohol-Zufuhr nach 30 min in 5 min.

zur Folge haben. Für die Praxis gilt demnach der Satz: Änderung des Blutalkoholwertes hat eine Änderung des Atemalkoholwertes in gleicher Richtung zur Bedingung.

Der „Verteilungskoeffizient", der angibt, wieviel Kubikzentimeter Atemluft die gleiche Menge Alkohol enthalten wie 1 cm³ Blut, wurde aus den verfügbaren Kurven wiederum bestimmt, wobei jedoch unberücksichtigt bleibt, daß ein Teil des Atemalkohols vom Reagens nicht

erfaßt wird. Es wurde gefunden, daß ein Vergleich mit dem früher angegebenen Modellversuch (Herausblasen von Alkohol aus einer vorgelegten wäßrigen Alkohollösung) nicht ohne weiteres möglich ist. Der von der Permanganatlösung erfaßbare Alkoholanteil ist nämlich nicht konstant, sondern ändert sich mit der Alkoholkonzentration in der Ausatmungsluft. Dies geht sehr schön aus der Tab. 1 hervor, die eine absteigende Reihe von höheren Atemalkoholwerten zu niederen zeigt. Bei einem Atemwert von 0,65 Ltr. beträgt der „Verteilungskoeffizient" 4160, während er für 1,05 Ltr. nur 3055 beträgt. Hieraus folgt, daß der Alkoholanteil, der vom Reagens nicht erfaßt wird, kein konstanter ist, sondern um so größer wird, je mehr Alkohol in der Atemlufteinheit vorhanden ist. Aus dieser eindeutig abfallenden Tendenz des „Verteilungskoeffizienten" von niederen Atemluftwerten zu höheren kann überdies die wichtige Tatsache gefolgert werden, daß offensichtlich die Art des Atmens (schnell, langsam, oberflächlich oder tief) nur einen geringen Einfluß auf den Atemalkoholwert bei der Bestimmung haben kann. Dies ist um so bedeutungsvoller, da jede Person gerade in dieser Hinsicht ein individuelles Verhalten zeigt, das nur schwer einer Norm angepaßt werden kann.

Tabelle 1. *Verteilungskoeffizienten des Alkohols zwischen Blut und Atemluft.*

Atemwert in Liter	Blutalkohol in ‰	Luftmenge in cm³, die gleiche Alkoholmenge enthält wie 1 cm³ Blut*
0,65	1,12	4160
0,70	1,04	4168
0,75	0,965	4135
0,80	0,895	4091
0,85	0,82	3968
0,90	0,74	3810
0,95	0,67	3610
1,00	0,59	3371
1,05	0,51	3055

* Ohne Berücksichtigung der Tatsache, daß ein Teil des Alkohols der Atemluft vom Reagens nicht erfaßt wird.

Ob das von uns früher diskutierte Vorliegen einer „augmentation limit" der Alkohol-Clearance der Lunge durch diese Befunde hinfällig wird, kann noch nicht gesagt werden, da die fraglichen Kurvenabschnitte im absteigenden Schenkel der Blutalkoholkurve aus technischen Gründen (Konzentrierung der Blutalkoholbestimmung auf die Zeit der Resorption, dadurch bedingter Mangel an Widmark-Kölbchen, größere Fehlerhaftigkeit der Capillarmethode bei längerem Aufbewahren) unberücksichtigt bleiben mußten. Eine Supponierung der Veränderlichkeit des vom Reagens nicht erfaßbaren Anteils an Atemalkohol dürfte jedoch wahrscheinlich sein.

Nachdem wiederum die praktisch gute Übereinstimmung zwischen Atem- und Blutalkohol bestätigt werden konnte, haben wir es unternommen, diese Relation quantitativ für den von uns nunmehr übersehbaren Bereich festzulegen. Dazu wurden in den Kurven der 17 Trinkversuche nacheinander zu bestimmten Blutalkoholwerten die zeitlich zugeordneten Atemwerte ermittelt. Aus diesen gemittelten Atemwerten für den Bereich von 0,5—1,15‰ Blutalkohol wurde die in Abb. 7 wiedergegebene Vergleichskurve gefunden, deren Anfangs- und Endabschnitt aus früheren Trinkversuchen nach unten bis 0,1 und nach oben bis 1,5‰ ergänzt wurden. Diese erlaubt nunmehr mit einer für die praktischen Belange ausreichenden Genauigkeit, aus einem mit der Atemalkoholapparatur der beschriebenen Art abgelesenen Atemluftwert zwischen 0,45 und 2,0 Ltr. unmittelbar den im Blut der Versuchsperson vorliegenden Blutalkoholwert (objektiver Gradmesser einer Alkoholintoxikation) anzugeben. Mit dem Bereich zwischen 0,5 und 1,15‰, der aus den Trinkversuchen 1—17 resultiert, dürften wir gerade den Abschnitt getroffen haben, wo die Abhängigkeit von Blut- und Atemalkohol praktisch linear verläuft. Bei höheren Werten von Blutalkohol rücken die zugehörigen Atemwerte wieder zusammen, während unterhalb von 0,5‰ Blutalkohol dieselben immer weiter divergieren. In dem gut zu übersehenden Bereich zwischen 0,5 und 1,2‰ entspricht 0,1‰ Blutalkohol ungefähr einer Atemluftmenge von 70 cm³. Die von uns in diesem Bereich ermittelte durchschnittliche Ablesefehlerbreite der Apparatur lag bei 40—50 cm³, das entspricht demnach in etwa der Widmarkschen Fehlerbreite der Blutalkoholbestimmung. Unterhalb von 0,5‰ nimmt dieser 0,1‰ Blutalkohol entsprechende Betrag an Atemluft schnell zu und erreicht zwischen 0,1 und 0,2‰ 330 cm³. Oberhalb von 1,2‰ nimmt dieser korrespondierende Wert dagegen noch weiter ab. Damit verbunden ist jedoch ein exakteres Ablesen des Farbumschlages bei entsprechend höheren Atemalkoholwerten, während derselbe bei niederen Atemalkoholwerten entsprechend protrahierter erfolgt.

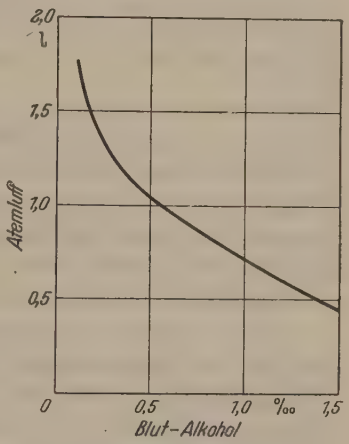


Abb. 7. Vergleichskurve zwischen Blutalkohol und Atemluftmenge.

Im Anfangsteil der Vergleichskurve kommt die außergewöhnlich große Empfindlichkeit der Methode zum Ausdruck. Man bedenke: eine alkoholfreie Atemluft vermag erst nach rund 20 Ltr. eine geringfügige

Abschwächung der Farbe des Reagenses herbeizuführen. Eine Atemluft, wie sie von einem Individuum mit nur 0,1‰ Blutalkohol geatmet wird, ergibt dagegen einen vollständigen Farbumschlag bereits bei 1,75 Ltr.

Diese Empfindlichkeit läßt sich in praxi sehr schön demonstrieren. Bei der Vorführung der Methode vor einem größeren Auditorium wurde zuerst eine Person, die keinen Alkohol genossen hatte, zum Atmen in die Apparatur veranlaßt. Nachdem nach etwa 5 Ltr. in die Apparatur geatmeter Luft noch keinerlei Farbveränderung des Reagenses aufgetreten war und der Versuchsperson das Pusten bereits unangenehm war, wurde eine zweite Person, die etwa 2 Std vorher 2 Glas Bier getrunken hatte, an die Apparatur geholt. Der Umschlag erfolgte prompt bei 1,21 Ltr.

Zusammenfassung.

1. In 17 Trinkversuchen wurden Blut- und Atemalkoholkurven gewonnen, die eine relativ gute Übereinstimmung zwischen Blut- und Atemalkohol erneut bestätigten. Verschiebung der Kurvenmaxima um höchstens 10—15 min. Jedem Ansteigen der Blutalkoholkurve entspricht ein Abfallen der Atemluftkurve und umgekehrt.

2. Der „Verteilungskoeffizient" zwischen Blut- und Atemalkohol sinkt mit steigendem Gehalt der Atemluft an Alkohol. Dies wird darauf zurückgeführt, daß der vom Reagens nicht erfaßte Alkoholanteil mit steigendem Alkoholgehalt größer wird.

3. Für den Bereich von 0,1—1,50‰ Blutalkohol wird aus 17 neu angestellten und früheren Trinkversuchen der zeitlich zugehörige Atemluftbereich ausgemittelt. Die sich ergebende empirische Vergleichskurve erlaubt zu jedem mit der Apparatur gefundenen Atemluftwert zwischen 0,45 und 2,0 Ltr., den Blutalkohol der untersuchten Person direkt abzulesen, d. h. mit Hilfe des verwendeten apparativen Prinzips läßt sich innerhalb des genannten Bereiches aus der geatmeten Luftmenge der objektive Grad einer Alkoholintoxikation mit einer für die praktischen Belange ausreichenden Genauigkeit ermitteln.

Literatur.

Seifert, P., u. H. Günther: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 37 (1951). — Bulmahn, E.: Diss. Heidelberg 1951. — Graefe, W.: Diss. Heidelberg 1951.

Dr. Dr. P. Seifert, Heidelberg, Institut für gerichtliche Medizin, Voßstraße 2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 433—440 (1952).

Aus dem Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Freerksen).

Über die reversible Inaktivierung des thyreotropen Hormons.

Von
Joachim Kracht.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. November 1951.)

Die physiologische Bedeutung des thyreotropen Hormons (TSH) beruht auf der Aktivierung der Schilddrüse in Form einer proteolytischen Hydrolyse des gespeicherten Thyreoglobulins und vermehrten Thyroxinausschüttung. Damit verbunden ist eine konsekutiv gesteigerte Jodidaufnahmefähigkeit und erhöhte Thyroxinsynthese. Die entsprechenden histologischen Kriterien bestehen in der Verflüssigung und Rückresorption des Kolloids mit nachfolgender Hypertrophie und Hyperplasie der Acinusepithelien.

Die TSH-Sekretion des Hypophysenvorderlappens wird normalerweise durch den Blut-Thyroxinspiegel in Form eines relaisartigen homeostatischen Regulationsmechanismus gesteuert. Unübersichtlicher liegen die Verhältnisse bei der Thyreotoxikose im Hinblick auf die Frage ihrer ausschließlich hypophysär-zentralen Genese. Es entsprechen nämlich nicht nur die cytologischen Befunde an Hypophysen menschlicher Thyreotoxikosen dem Normalbild (Wegelin), sondern der TSH-Nachweis im Serum und Harn bei echten Thyreotoxikosen ist auch negativ (Rawson, Purves und Griesbach). Man muß daraus folgern, daß die pathogenetische Bedeutung einer Hypersekretion von TSH entweder überschätzt wurde oder noch andere Mechanismen (wie z. B. die Sensibilisierung der Schilddrüse auf normale Thyreotropinimpulse oder chemische Reaktionen zwischen TSH und Schilddrüse) hinzukommen.

Erste Hinweise dafür, daß chemische Beziehungen zwischen Jod und TSH bestehen, gab neben den therapeutischen Erfahrungen der Jod-Jodkalibehandlung nach Plummer der invitro-Befund einer direkten thyreotropininaktivierenden Wirkung von Schilddrüsengewebe (Rawson u. Mitarb.). Auch Thymus und Lymphknoten haben diese Fähigkeit, wenn auch in geringerem Maße, allen übrigen Organen fehlt sie vollständig. Als Folge einer TSH-Inaktivierung durch Jod sind auch unsere Ergebnisse zur Therapie der Schreckthyreotoxikose beim Wildkaninchen zu deuten, denn bei kombinierter Methylthiouracil- und Jodbehandlung zeigte sich eine deutliche, von der Dosis elementaren Jods abhängige histologische Ruhigstellung der Schilddrüse trotz gleichzeitig vermehrter Thyreotropinsekretion. Albert u. Mitarb. haben außerdem auf eine in vitro-Inaktivierung von TSH durch Jod und auf die Reversibilität des Prozesses durch Reduktionsmittel (besonders antithyreoidale Substanzen) hingewiesen. Diese Autoren stellten fest, daß

die Jodierung von TSH zu einem braunen Präcipitat führt, welches seine Aktivität in Abhängigkeit von der zugeführten Joddosis weitgehend oder total eingebüßt hat. Es enthält insgesamt 40 γ J pro Einheit TSH, von denen 24 γ locker gebunden sein und sich durch Aceton auswaschen lassen sollen. Diese nur noch schwach braun-gelb gefärbte Fraktion hatte die Ausgangsaktivität pro Einheit TSH wiedererlangt. Man folgerte daraus, daß Inaktivierung nur durch Jodüberschuß zu erzielen sei und die restlichen 16 γ fester gebundenes Jod keine inaktivierende Potenz besitzen. Die TSH-Inaktivierung durch Jod wurde dabei als Oxydationsvorgang aufgefaßt und die Reversibilität durch antithyreoidale Substanzen auf deren reduzierende Eigenschaften zurückgeführt. Fundierte Aussagen über den chemischen Vorgang selbst waren den Autoren in Anbetracht des noch unbekannten chemischen Aufbaus des thyreotropen Hormons nicht möglich.

Mit den vorliegenden Untersuchungen wird versucht, zur weiteren Aufklärung der reversiblen Inaktivierung von TSH unter in vitro- und in vivo-Bedingungen beizutragen.

Jeweils 1 Amp. Pretiron-Schering* (28,6 mg Protein = 500 Junkmann-Schoeller- oder Meerschweincheneinheiten = MsE) in 1 ml H_2O gelöst, wurde mit 20 ml Lugolscher Lösung (1 g J und 2 g KJ ad 100 ml H_2O) versetzt und das Gemisch auf 28 ml mit H_2O aufgefüllt. Es entstand sofort eine braungefärbte Fällung, die nach 2 Std durch Schütteln gleichmäßig verteilt, in 5 gleichen Teilen abzentrifugiert wurde und für alle folgenden Versuche als Ausgangsmaterial diente. Das braune Präcipitat wurde für sich untersucht, aber auch jeweils zu gleichen Teilen von 100 MsE mit verschiedenen Substanzen versetzt. Der Zusatz von 2,5 ml n/100 $Na_2S_2O_3$ ließ die braune Farbe des Jodaddukts verschwinden und eine weiß-trübe Flüssigkeit entstehen. 0,03 ml einer 10%igen Ascorbinsäure entfärbte das braune Präcipitat spontan zu einer klaren, farblosen Flüssigkeit, die sich nicht vom gelösten Original-TSH unterschied. Zu der gleichen Aufhellung führte der Zusatz von 3 ml einer 1%igen NH_3-Lösung. In Aceton löste sich das braune Präcipitat ohne sinnfällige Farbänderung; auch durch Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuumexsiccator, erneutes Aufnehmen des Rückstandes mit Aceton und dessen nochmalige Entfernung gelang es nicht, eine im Aussehen wesentlich schwächer gefärbte Substanz zu erhalten. Der Jodnachweis mit Stärke fiel in den Fraktionen mit $Na_2S_2O_3$, Ascorbinsäure und NH_3 negativ, in den acetonbehandelten Proben bzw. nach zehnmaliger H_2O-Auswaschung noch eindeutig positiv aus.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden 500 MsE Pretiron in 8 ml H_2O gelöst und gleiche Anteile von 100 MsE sowohl in reiner Form angewandt als auch nach Hinzufügen von 0,03 ml 10%iger Ascorbinsäure und in einer weiteren Fraktion von 2 ml Bromwasser; dabei kam es im Gegensatz zum Jodversuch zu keiner Fällung. Die TSH-Bromwasser-Fraktion wurde außerdem nach Durchleiten von H_2 während einer Dauer von 10 min untersucht. Ein weiteres Material ergab sich durch die Beobachtung, daß sich der jodierte TSH-Komplex nach 5 Tagen zu einer weiß-trüben homogenen Verbindung entfärbte, die mit Stärke keine Jodreaktion mehr ergab.

Für den Tierversuch benutzten wir etwa 250 g schwere Meerschweinchen, deren Schilddrüsen während einer Dauer von 14 Tagen vor Versuchsbeginn durch eine täglich oral pipettierte Lugolsche Lösung (1 ml mit 250 γ freiem Jod) ruhiggestellt wurden. Die mittlere Zellhöhe (mZ.) des gleichmäßig flachkubischen

* Der Schering-A.-G., Berlin, danken wir für Versuchsmengen von Pretiron, der Fa. C. F. Boehringer Söhne, Mannheim, für die Überlassung von Methylthiouracilampullen.

Follikelepithels betrug bei diesen in der Folge unbehandelten Kontrolltieren ohne signifikante Schwankungen 5,9 μ, so daß ein einheitliches Epithelniveau als Ausgangsmaterial vorausgesetzt werden konnte. Von jeder Fraktion erhielten jeweils 3 Tiere an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 5 MsE täglich s.c. verabfolgt. Die Tötung erfolgte am 4. Tag. Die Schilddrüsen wurden gewogen, nach Bouin fixiert, in Paraffin eingebettet und nach Goldner gefärbt. Zur Bestimmung der mittleren Zellhöhe wurden mit einem Schraubenokularmikrometer je 200 Epithelien pro Tier, und zwar an 50 Follikeln bei 3, 6, 9 und 12 des Uhrzeigersystems, ausgemessen und aus den Werten von 3 Tieren der Mittelwert bestimmt.

Die histometrischen Ergebnisse sind in Tab. 1 und 2 zusammengefaßt. Auf eine Angabe des Schilddrüsengewichts wurde verzichtet, da die Meerschweinchenschilddrüse großen physiologischen Größenschwankungen unterworfen ist. Tab. 1 zeigt als Gegenpol zur geplummerten Ruheschilddrüse (mZ. 5,9 μ) unter TSH ein hyperaktives Bild mit hochzylindrisch-papillärem Epithel, Kolloidverflüssigung und -rückresorption, intracellulären Kolloidtröpfchen und erhöhtem Mitoseindex bei einer mZ. von 15,2 μ. Das jodierte TSH (braunes Präcipitat) hat indessen seine thyreotrope Aktivität weitgehend verloren; das kubische, durchweg regelmäßig vacuolisierte Epithel (mZ. 7,2 μ) gehört gerade noch in das Bild der Ruheschilddrüse. Gleichartig verhält sich das mit Bromwasser versetzte TSH (mZ. 6,8 μ), während Ascorbinsäure die thyreotrope Aktivität nur geringfügig negativ beeinflußt. Es zeigt sich also eine eindeutige Inaktivierung von TSH durch Jod und Brom, die prozentual, verglichen mit der Ausgangslage, 86 bzw. 89% beträgt (Abb. 1).

Tabelle 1. *In vitro-Inaktivierung von TSH.*

Material	mZ. in μ
Kontrolle	5,9
3 mal 5 MsE TSH	15,2
3 „ 5 „ TSH + Ascorbinsäure	13,5
3 „ 5 „ jodiertes TSH	7,2
3 „ 5 „ bromiertes TSH	6,8

Tabelle 2. *In vitro-Reaktivierung von inaktiviertem TSH.*

Material	mZ. in μ
3 mal 5 MsE jodiertes TSH + $Na_2S_2O_3$	12,5
3 „ 5 „ „ TSH + Ascorbinsäure	10,4
3 „ 5 „ entfärbtes jodiertes TSH	10,45
3 „ 5 „ jodiertes TSH, ausgewaschen in H_2O	8,9
3 „ 5 „ „ TSH, behandelt mit Aceton	8,7
3 „ 5 „ „ TSH + NH_3	6,0
3 „ 5 „ bromiertes TSH, nach Durchleiten von H_2	10,45

Die grundsätzliche Möglichkeit einer Reversibilität dieses Aktivitätsverlustes zeigt Tab. 2, wonach der Zusatz von $Na_2S_2O_3$ zur jodierten Verbindung eine Reaktivierung um 55% zur Folge hat. Diese Fraktion

führt mit einer mZ. von 12,5 μ bei zylindrisch-vacuolisiertem Epithel, erhöhter Mitosezahl und entsprechenden Kolloidbefunden zum Bilde der aktivierten Schilddrüse. Einen gleichartigen, wenn auch schwächeren Effekt bewirkt Zusatz von Ascorbinsäure (mZ. 10,4 μ) zur jodierten Verbindung, während deren Behandlung mit Aceton (mZ. 8,7 μ) und H_2O (mZ. 8,9 μ) wesentlich weniger eindrucksvolle Ergebnisse zeitigt.

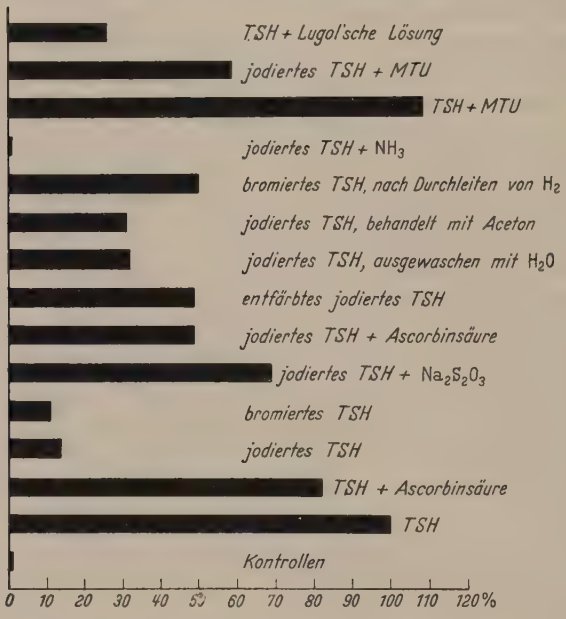


Abb. 1. Thyreotrope Aktivität aller Versuchsgruppen in prozentualer Darstellung.

NH_3 ist bezüglich einer Reaktivierung des jodierten TSH vollkommen unwirksam. Das Epithel- (mZ. 6,0 μ) und Kolloidbild entspricht dem der geplummerten Kontrollen und läßt selbst örtliche geringfügige Aktivitätszeichen wie beim brauen Präcipitat vermissen. Dagegen hat das Durchleiten von Wasserstoff durch die bromierte Verbindung eine Reaktivierung um fast 40% zur Folge. Überraschend erscheint die wesentlich stärkere Aktivität des nach einigen Tagen jodfreien entfärbten brauen Präcipitats mit einer mZ. von 10,45 μ gegenüber 7,2 μ des frisch bereiteten Gemisches. Eine Übersicht der unterschiedlichen morphokinetischen Effekte der verschiedenen Versuchsgruppen unter- und zueinander gibt nach prozentualer Auswertung der histometrischen Ergebnisse Abb. 1.

Zur Beurteilung, inwieweit diese Resultate auch in vivo Gültigkeit besitzen, wurden die entgegengesetzten Prinzipien unabhängig voneinander den Tieren verabfolgt, und zwar jeweils 3mal 5 MsE reinen oder

jodierten Thyreotropins und 1 ml einer 5%igen Methylthiouracillösung (MTU-Boehringer) s.c. bzw. 1 ml einer Lugolschen Lösung mit 250 γ freien Jods oral (Tab. 3). MTU verstärkt, wenn auch wegen der schwachen Dosis nur geringfügig, die Wirkung des TSH (mZ. 16,06 μ), obwohl eine

Tabelle 3. *In vivo-Reaktionen von aktivem und inaktiviertem TSH mit Methylthiouracil bzw. Jod.*

Material	mZ. in μ
3 mal 5 MsE TSH + MTU	16,05
3 „ 5 „ jodiertes TSH + MTU	11,4
3 „ 5 „ TSH + Lugolsche Lösung (250 γ J)	8,32

hypophysär kompensatorische Thyreotropinsekretion wie nach längerer Applikation antithyreoidaler Substanzen entfällt. Jodiertes TSH wird durch MTU deutlich reaktiviert (mZ. 11,4 μ), und Lugolsche Lösung inaktiviert das Original-TSH (mZ. 8,32 μ) ähnlich wie unter invitro-Bedingungen. Als Parallele hierzu können die Epithelwerte der behandelten Wildkaninchenschilddrüsen angeführt werden, deren mZ. unter MTU 11,67 μ, nach MTU + Lugol (100 γ Jod) 10,38 μ, nach MTU + Lugol (500 γ J) 6,98 μ und nach alleiniger Behandlung mit Lugolscher Lösung (500 γ J) 6,18 μ betrug.

Den in vitro- und in vivo-Verhältnissen gemeinsam ist die dosisabhängige TSH-inaktivierende Potenz des freien Jods, wogegen Jodide die thyreotrope Aktivität weder entscheidend hemmen noch in vitro zu einem schwerlöslichen Proteinkomplex mit TSH — ähnlich dem braunen Präcipitat — führen. Es darf als gesichert gelten, daß lediglich elementares Jod für die Aktivitätsminderung von Bedeutung ist. Sie tritt nur bei Jodüberschuß ein und ist stets dann am deutlichsten, wenn kleine Quanten TSH mit großen Jodmengen in Reaktion gebracht werden. Dieses Moment ließe daran denken, daß Jod per se, d. h. allein durch seine Anwesenheit und im Überschuß, wirkt, zumal nach Albert und Mitarbeitern Parallelen zwischen Inaktivierung und Jodabsorption nicht gegeben sind. Außerdem konnten diese Autoren weder eine theoretisch mögliche Thyroxinentstehung im jodierten Protein noch einen Aktivitätsverlust des TSH durch simultan zugesetztes Thyroxin nachweisen. Auch eine Beeinträchtigung der Reaktionsfähigkeit der Schilddrüse durch den Jodüberschuß bzw. gestörte Absorptionsverhältnisse sind in Anbetracht der Versuchsdauer und der gleichzeitig unbeeinflußten gonadotropen Aktivität (Hodengewicht) jodierter Hypophysenextrakte unwahrscheinlich. Die Bedeutung des Jodüberschusses für die Inaktivierung geht aus dem Vergleich der epitheliotropen Effekte des braunen Präcipitats mit 86% gegenüber 51% Aktivitätsverlust der entfärbten jodfreien Verbindung hervor. Hieraus ist abzuleiten, daß eine Jodadditionswirkung zwar wesentlich ist, aber nicht ausschließlich vorliegen

kann, da die volle thyreotrope Aktivität durch Entfernung von Jod nicht wieder hergestellt wird, obwohl eine Denaturierung in Anbetracht der Reversibilität des Prozesses auszuschließen ist. Die entfärbte Verbindung nimmt aktivitätsmäßig vielmehr eine Mittelstellung zwischen jodiertem und Original-TSH ein (Abb. 1). In gleicher Weise führt $Na_2S_2O_3$ trotz Reaktion mit dem additiv gebundenen Jod lediglich zu einer partiellen Reaktivierung. Es ist deshalb ein zusätzlicher Mechanismus anzunehmen, der für den Hauptanteil der Reaktivierung verantwortlich ist und sowohl in einer Jodsubstitution (vgl. oben) als auch in einer chemischen Umsetzung des TSH selbst liegen könnte. Der Inaktivierungsvorgang wäre demnach in 3 Gruppen zu unterteilen, nämlich:

1. Jodsubstitution, 2. Jodaddition, 3. Oxydativer Vorgang.

Jodaddition und oxydativer Prozeß sind dabei dominierend, während der Jodsubstitution nach den erwähnten Untersuchungen von Albert keine Bedeutung zukommt. Die additive Jodwirkung könnte — vergleichbar mit der Jodfällungsreaktion der Alkaloide — auf einer lockeren Anlagerung von Jod an basische Stickstoffgruppen beruhen, womit auch die Schwerlöslichkeit des Präcipitats erklärbar wäre.

Für die Annahme einer oxydationsbedingten Inaktivierung spricht, daß sowohl elementares Jod als auch Brom starke Oxydationsmittel sind und der Inaktivierungsvorgang durch Reduktionsmittel reversibel ist.

Eine weitere Stütze für diese Annahme liegt in der Wirkung des Zusatzes von Bromwasser und der Aktivitätsregeneration nach Durchleiten von H_2. Nach Albert wirken auch andere Reduktionsmittel (KSCN, Ascorbinsäure) und besonders antithyreoidale Substanzen reaktivierend, aber nicht durch ihre Anwesenheit, weil ihre Entfernung nach erfolgter Reaktion durch Dialyse oder Fällung mit Ammonsulfat keine Verminderung des wiedergewonnenen Aktivitätsanteils nach sich zieht. $Na_2S_2O_3$ wirkt durch seine Reaktion mit Jod ($J_2 + 2\,Na_2S_2O_3 \rightarrow 2\,NaJ + Na_2S_4O_6$) und hatte in unseren Untersuchungen die stärkste reaktivierende Potenz. Die Wirkung der Ascorbinsäure erscheint in dreifacher Hinsicht bedeutungsvoll, als einmal eine direkte Reaktion mit Jod ($C_6H_8O_6 + J_2 \rightarrow C_6H_6O_6 + 2\,HJ$) und eine Reduktion des oxydierten TSH möglich und auf der anderen Seite auch eine oxydative Wirkung gegeben ist, wie die Aktivitätsminderung des Original-TSH zeigt. Letztere könnte auf eine H_2O_2-Entstehung zurückzuführen und für die geringgradige Inaktivierung bei Zusatz zum Original-TSH verantwortlich sein. Oxydations- und Reduktionspotential wirken bei der Reaktivierung der jodierten Verbindung durch Ascorbinsäure einander entgegen, ohne daß es möglich wäre, für die einzelnen Vorgänge prozentuale Zahlen anzugeben. Die Epithelwerte nach mehrmaliger H_2O-Auswaschung oder Lösen des braunen Präcipitats in Aceton zeigen lediglich die generelle Richtung einer Reaktivierung an. Die Reaktivierung der jodierten Verbindung durch Aceton ist kleiner als nach den Ergebnissen von Albert, aber deutlich zu erkennen. Es ist anzunehmen, daß durch das mehrmalige Auswaschen mit H_2O bzw. durch das Abdampfen des Acetons der Anteil locker gebundenen Jods vermindert und diese Differenz im

Jodüberschuß für den beobachteten Reaktivierungsgrad verantwortlich ist. Das Ausbleiben einer Reaktivierung nach NH_3-Zusatz muß ähnlich dem Resultat von Albert mit NaOH auf eine Eiweißdenaturierung zurückgeführt werden. Das Ausmaß des beschriebenen Oxydationsmechanismus wird im wesentlichen vom Redoxpotential des zugefügten Substrats bestimmt. Die hiermit verbundenen chemischen Reaktionen sind weitgehend unbekannt. Gesichert ist nach den Untersuchungen von Ciereszko, daß das gereinigte Protein 1,2% Schwefel enthält. Da die Inaktivierung von Proteinen und Fermenten vielfach auf einer Oxydation von SH-Gruppen zu den entsprechenden Disulfidverbindungen beruht, ist für die Inaktivierung des TSH, wie schon Albert vermutete, ein gleichartiger Effekt anzunehmen. Umgekehrt wäre die Reaktivierung als Reduktion des Disulfids zur SH-Gruppierung aufzufassen.

Ob auch unter physiologischen Bedingungen die TSH-inaktivierende Wirkung von Jod und Schilddrüsenexplantaten (Rawson) von Bedeutung ist, bleibt offen, da die in vitro-Verhältnisse nicht mit dem komlizierteren Wirkungsmechanismus im lebenden Organismus identisch zu sein brauchen. Bekannt ist jedoch die involvierende Wirkung von elementarem Jod auf thiouracil- und TSH-behandelte Schilddrüsen, wogegen Jodide keine Wirkung zeigen. Der Schwerpunkt der antithyreoidalen Wirkung liegt entweder in der Fähigkeit, elementares Jod unmittelbar oder bei seiner Entstehung zu reduzieren bzw. ein hypothetisches jodid-oxydierendes Enzym zu inhibieren. Das Jod-TSH-Gleichgewicht wird dadurch zugunsten des TSH verschoben, wobei für die initiale Epithelaktivierung eine kompensatorisch vermehrte Ausschüttung aus dem Hypophysenvorderlappen nicht gefordert zu werden braucht. Durch die unterbundene Jodidoxydation und den offenbar ebenfalls reduktionsbedingten Verstärkungseffekt der antithyreoidalen Substanzen (augmenting effect nach Rawson) wäre die Schilddrüse für einen physiologischen TSH-Spiegel sensibilisiert. Da die aktivitätssenkende Jodwirkung dosisabhängig ist, scheint ein Hinweis gegeben, daß das TSH-Jod-Gleichgewicht erst durch einen Jodüberschuß durchbrochen wird, der nun seinerseits das thyreotrope Hormon auf oxydativem Wege bremst.

Nach den Untersuchungen von Rawson vermag die thyreotoxische Struma doppelt so viel TSH zu inaktivieren als eine euthyreotische Schilddrüse; darüber hinaus kann sie vermehrt Jodide aufnehmen. Ohne Berücksichtigung einer zusätzlichen Beteiligung der Hypophyse am Jod-TSH-Chemismus erscheint es wesentlich, daß TSH in Serum und Harn thyreotoxischer Patienten nicht nachgewiesen wurde (Rawson, Purves und Griesbach), obwohl angenommen werden darf, daß ihre Schilddrüsen unter einer gesteigerten TSH-Stimulierung stehen. Dieser Effekt ist nur durch eine erhöhte TSH-Inaktivierung durch hyperplastisches Schilddrüsengewebe möglich, wobei zusätzliche Jodgaben etwa nach Art der Plummerung zu einer weiteren Aktivitätssenkung und damit zur Kolloidstruma mit wieder regelmäßigem Follikelepithel und normalem Jodgehalt führen.

Eigene Untersuchungen über den diskutierten Verstärkungseffekt wurden in vivo mit TSH + MTU durchgeführt, mußten aber aus

Gründen der nur geringen zur Verfügung stehenden Pretironmenge beschränkt bleiben. Danach ist die histologische Aktivierung noch extremer als nach TSH allein, was allerdings in den Epithelwerten (mZ. 16,05 μ : 15,2 μ) weniger zum Ausdruck kommt, die noch in den Rahmen physiologischer Streuungen gehören. Die gleichzeitige Applikation von TSH und Lugolscher Lösung führt als in vivo-Parallele zu den in vitro-Versuchen mit jodiertem TSH zu einem erheblichen Aktivitätsverlust, der analog den Ergebnissen von antithyreoidaler und Jodtherapie am Wildkaninchen bei weiterer Steigerung der Joddosis eine noch stärkere Aktivitätssenkung erwarten läßt. Andererseits führt die kombinierte in vivo-Applikation von jodiertem inaktiven TSH und MTU zu einer Aktivitätsregeneration, für die eine kompensatorische zusätzliche TSH-Ausschüttung durch die Hypophyse unwahrscheinlich ist; vielmehr kann der Reaktivierungsgrad auf die reduktive Potenz des MTU zurückgeführt werden. Die beiden letzten Versuchsanordnungen dürfen als Parallele zu den in vitro-Versuchen gewertet werden und erlauben den Schluß, daß im lebenden Organismus vielleicht ähnliche Inaktivierungs-Reaktivierungsmechanismen vorliegen.

Zusammenfassung.

Thyreotropes Hormon wird in vitro durch elementares Jod oder Bromwasser weitgehend inaktiviert. Die partielle Reversibilität dieses Prozesses durch $Na_2S_2O_3$ und Reduktionsmittel, wie Wasserstoff und Ascorbinsäure, läßt darauf schließen, daß für die Inaktivierung neben einer Jodadditionswirkung vor allem ein oxydativer, für die Reaktivierung ein Reduktionsvorgang verantwortlich ist, der möglicherweise auf einer rückläufigen Überführung von SH-Gruppen zum Disulfid beruht. Einzelheiten hierzu bleiben in Anbetracht des unaufgeklärten chemischen Aufbaus des thyreotropen Hormons offen. Paralleluntersuchungen deuten darauf hin, daß ein ähnlicher Jod-TSH-Chemismus auch im lebenden Organismus vorhanden ist und in der Physiologie des Jodstoffwechsels berücksichtigt werden muß.

Literatur.

Albert, A., R. W. Rawson, P. Merrill, B. Lennon and Ch. Riddell: J. of Biol. Chem. **166**, 637 (1946). — Endocrinology **40**, 299, 303, 361 (1947). — The 1942—1946 Transactions of the Amer. Assoc. for the study of goiter, S. 131. — Ciereszko, L.: J. of Biol. Chem. **160**, 585 (1945). — Kracht, J., u. U. Kracht: Virchows Arch. **321**, 238 (1952). — Purves, H. D., and W. E. Griesbach: Brit. J. Exper. Path. **28**, 46 (1947); **30**, 23 (1949). — Rawson, R. W., and W. L. Money: Rec. Progr. in Horm. Res. 1949, IV, 397. — Wegelin: Henke-Lubarsch: Handb. spez. path. Anat. **8** (1926).

Dr. J. Kracht, Borstel über Bad Oldesloe, Tuberkulose-Forschungsinstitut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 441—446 (1952).

Die Ähnlichkeit der Clearance-Werte*.

Von

Ernst Frey.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 18. August 1951.)

Allgemein bemißt man die Menge des Glomerulusfiltrates nach der Ausscheidung von Testsubstanzen wie Inulin oder Mannitol, indem man die Kubikzentimeter Plasma berechnet, welche durch die Ausscheidung davon gereinigt würden, also eine fiktive Größe, Clearance genannt. Sie beträgt für diese beiden Stoffe 135 cm^3/min. Sie liefern identische Zahlen, während die Clearancewerte von Sulfat, Kreatinin mehr oder weniger davon abweichen, oder auch der Zucker nach Phlorrhizinvergiftung, welche nach Poulsson[1] die Rückresorption des filtrierten Zuckers durch die Tubuli verhindert; aber diese Hinderung betrifft nur den oberen Teil der proximalen Tubuli, während er in den tieferen Teilen als Glykogen in mächtigem Ausmaß in den Zellen angehäuft wird, die dadurch anschwellen (Oliver[2]). Kreatinin besitzt nach den Angaben von Gukelberger[3] eine Clearance von 98 cm^3/min im Durchschnitt, während die Inulin-Clearance 159 cm^3/min betrug. Näher an den Zahlen für Inulin liegen die von Ferrocyanid und nach Eggleton und Habib[4] auch von Thiosulfat bei Mensch und Hund, nur für Katzen ist dieser Stoff ein schweres Nierengift, was verwunderlich ist, wenn er nur durch Filtration in den Harn gelangt, ohne rückresorbiert oder sezerniert zu werden. Aus dieser mehr oder minder großen Übereinstimmung hat man geschlossen, daß dem Clearance-Wert dieser Stoffe eine reale Bedeutung zukomme, nämlich daß er die Menge des Glomerulusfiltrates anzeige, so daß also ein solches Quantum Plasma von ihnen befreit würde. Diese Auffassung hat schnell allgemeine Anerkennung gefunden — psychologisch vorbereitet durch den Begriff der Blutreinigung, der Clearance (van Slyke[5]).

Gegen diese Annahme sprechen eine Anzahl von Beobachtungen. Zunächst liegen die Verhältnisse nach Wassergaben außerordentlich auffällig; je mehr Harn fließt, desto größer wäre die Zurücknahme von Wasser in den Tubuli, wenn man nach der Kreatininmethode rechnet (E. Frey[6]). Dabei würden große Mengen von Kochsalz zurückresorbiert, z. B. beim Kaninchen in 5 min etwa 1 g. Sodann fand man bei der kindlichen Niere die Inulin-Clearance sehr viel kleiner als die von Harnstoff, Phosphat, Natrium und Chlor (Dean und McCance[7]), während beim Erwachsenen die Inulinclearance 135 und die von Harnstoff 37,7 cm^3/min betrug. Dieser Befund ist also mit der Annahme der alleinigen Filtration des Inulins unvereinbar. Ferner fand Barclay[8] bei Berechnung der maximalen Tubulusausscheidung von p-Aminohippursäure (PAH) und Diodrast (Perabrodil) negative

* Herrn Prof. Dr. R. Schoen, Göttingen, zum 60. Geburtstag gewidmet.

Werte, wenn er von der Gesamtmenge die angeblich filtrierte abzog, ein Zeichen, daß letztere zu hoch angesetzt wurde, dem Inulinmaß entsprechend. Außerdem beeinflussen sich die tubulär sezernierten Substanzen, hemmen sich gegenseitig, was man als mutual depression oder competition (Konkurrenz) bezeichnet hat; nun fanden aber Kuschinsky und Langecker[9] auch eine Hemmung der Kreatininausscheidung, die ja nur durch Filtration allein vor sich gehen soll, durch einen sicher durch Sekretion eliminierten Stoff wie das Phenolrot (Marshall[10]), was doch Bedenken erregt. (In ähnlicher Weise stieg die Phosphatausscheidung von 7% auf 26% bei 60 mg% PAH im Plasma an [West und Rapoport[11]].)

Im allgemeinen liegt die Filtration nach dieser Annahme an der oberen Grenze der Leistungsfähigkeit, variiert nur sehr wenig, und dies widerspricht der direkten Beobachtung der lebenden Niere, an der man Veränderung der Glomerulustätigkeit an dem Dunklerwerden der Glomeruli bei einer Filtrationsdiurese sehen kann, wo gleichzeitig helle Halbmonde an der Seite des Glomerulus auftreten (E. Frey[12]); es kann also diese Diurese nicht durch Hemmung der Rückresorption zustande kommen. Auch Richards und Schmidt[13] sahen diese Veränderung bei der Zuckerdiurese, ein Bild, welches in das Buch von Cushny[14] übergegangen ist. Endlich zeigen die früher vielfach ausgeführten Versuche mit Messung des Nierenvolumens die Zunahme der Blutfülle des Glomerulus bei solchen Filtrationsdiuresen, z. B. bei Gottlieb und Magnus[15] oder bei Reid[16], und es kann nicht nur die Zahl der aktiven Glomeruli wechseln, sondern es können auch die einzelnen Schlingen eines Glomerulus verschieden stark durchblutet sein.

Wenn also auch der Schluß auf eine ausgiebige Filtration aus der annähernden Übereinstimmung der Clearancewerte mehrerer Stoffe zu weitgehend erscheint, so ist diese Übereinstimmung doch vorhanden. Sie trifft nicht nur für diese Substanzen, die man als Maß der Filtration ansieht, zu, sie findet sich ebenso bei der sicherlich tubulären Ausscheidung von PAH und Diodrast untereinander — abweichend von der der vorgenannten Stoffe —, und man muß daraus schließen, daß die Transfereinrichtungen der Tubuli sehr ähnlich sein können oder von mehreren Stoffen in der gleichen Weise benutzt werden, wofür die gegenseitige Hemmung spricht.

Wie früher[17] gezeigt wurde, geht die tubuläre Ausscheidung dann am flottesten vor sich, wenn schon die Konzentration im Tubulusharn groß ist, und zwar proportional der schon erreichten Konzentration; der Reiz zur Absonderung geht also vom Tubulusharn aus. Es wächst die Konzentration im Tubuluslumen mit der schon erreichten Konzentration nach Art des Zinseszins, und es findet umgekehrt wie bei der Ausscheidung eines Stoffes im ganzen nicht ein Abfall der Ausscheidung statt, sondern eine Zunahme. Dort wird immer ein bestimmter Teil der noch im Körper vorhandenen Menge ausgeschieden, wie Michaelis und Maass[18] zuerst für die Borsäure (von der 5. Std an, wenn die Verteilung im Körper vollendet ist) zeigten, also folgt die Ausscheidung der Formel ae^{-ct}, wenn a die Anfangsmenge, t die Zeit und c eine Konstante ist. Die Sekretion der Tubuli dagegen verläuft in Form von ae^{+ct}. Für die Ausscheidungstendenz, das Ausscheidungsbestreben der Tubuli, ist die

Konstante c ein Maß. Es erfolgt also die Sekretion im Tubulus nach der Formel $dx/dt = c\,(a + x)$, worin a die Anfangsmenge, x die in der Zeiteinheit dazusezernierte Menge und t die Zeit bedeutet; c ist dabei eben die Konstante der Ausscheidung. Die Anfangsmenge ist der durch Filtration gelieferte Teil (also cm³ provisorischer Harn mal Plasmakonzentration). Zur Rechnung trennt man die Variablen: $dx/(a + x) = ct$ und integriert: $ln(a + x) = ct + C$; zur Zeit null wird $a + x$ zu a und ct zu null, daher C zu $ln\,a$. Dies ergibt die Gleichung $ln(a + x)/a = ct$. Nun ist t immer gleich 1 min; der Wert der Konstanten c ist also gleich $ln(a + x)/a$. Dies ist die Ausscheidungstendenz. Die ausgeschiedene Menge ist gleich ae^c.

Die Ausscheidungstendenz ist groß bei Stoffen, bei denen das Venenblut die Niere frei vom Prüfstoff verläßt, bei PAH oder Diodrast, welche deswegen den Plasmadurchfluß anzeigen. Hier ist die Blutreinigung am weitgehendsten. Ich benutze die Zahlen von H. W. Smith (S. 44), der für PAH durchschnittlich eine Harnkonzentration von 4,15 mg/cm³ und eine Harnmenge von 2,75 cm³/min angibt, also eine Gesamtausscheidung von 11,3295 mg/min. Die filtrierte Flüssigkeitsmenge nehme ich zu 5 cm³/min an (entsprechend der Harnkonzentrierung nach dem Δ, wie früher auseinandergesetzt); dies ergibt eine filtrierte Anfangsmenge bei einer Plasmakonzentration von 0,0158 mg/cm³, von 5mal 0,0158 gleich 0,079 mg/min. Das Verhältnis von Gesamtmenge zu filtrierter Menge ist also gleich 11,3295/0,079 gleich 143 und der ln davon 4,957, also 4,96; dies ist die Ausscheidungstendenz. Die ausgeschiedene Menge ist dann gleich $a \cdot e^{4,96}$, d. h. gleich 0,079 mal 142,6 gleich 11,2654, wie oben. Dies stellt wohl die höchste Ausscheidungstendenz dar. Die Clearance daraus berechnet beträgt 713 cm³/min, wie sie Smith angibt.

Um wirkliche Werte für den provisorischen Harn zu gewinnen, wurde in einer Arbeit von J. Frey und W. Schmidt[20] bei 14 Personen die Ausscheidung von Perabrodil nach der üblichen Methode untersucht; die Zahlen der 64 Proben lauten im Durchschnitt: Provisorischer Harn 4,93 cm³/min, gewonnen aus der definitiven Harnmenge (2,17 cm³/min und dem Harn-Δ von — 1,368°). Diese Menge Filtrat ist also den oben angenommenen 5 cm³ sehr ähnlich. Die Plasmakonzentration war 17,4 γ/cm³, also filtrierte Menge 4,93 mal 17,4 = 85,78 γ/min; daher das Verhältnis von Gesamtmenge (9770 γ/min) zu Anfangsmenge (85,78) gleich 113,9 und der ln davon 4,72995, also 4,73. Dies ist die Ausscheidungstendenz für Perabrodil. Der Exponent von e; er ist dem für PAH sehr ähnlich. Die Gesamtmenge ergibt sich zu 85,78 mal $e^{4,73}$ gleich 9718 γ/min, wie oben. Die Clearance berechnet sich aus allen Zahlen zu 561 cm³/min, bei Fortlassung der renalen Hypertonien zu 610 cm³/min.

Diese Rechnungen sollen die Möglichkeit der Bestimmung einer Ausscheidungstendenz der Tubuli darstellen, sie lauten für PAH 4,96 und für Perabrodil 4,73. (Das Übereinstimmen der Endzahlen ist selbstverständlich, da der Exponent ja aus den vorliegenden Zahlen berechnet

wurde.) Diese Werte stellen also wohl die höchste Ausscheidungstendenz dar.

Wenn man nun die gleiche Rechnung bei den Stoffen ausführt, welche als Maß der Filtration benutzt werden, so greife ich wieder auf die Werte von Smith zurück, diesmal für Inulin. Man erhält die filtrierte Menge (5 cm³/min mal Plasmakonzentration von 0,244 mg/cm³) gleich 1,22 mg/min, die Gesamtmenge (2,73 cm³/min Harn und 12,1 mg/cm³ Harnkonzentration) gleich 33,033 mg/min. Der *ln* 33/1,22 = 3,2939, also gleich 3,3 und für $e^{3,3}$ 27,12. Die ausgeschiedene Menge ist also 1,22 mal 27,12 gleich 33,086 mg/min und die Clearance gleich 135,5 cm³/min, wie gefunden. Es wäre also für Inulin der Exponent nicht wie bei PAH 4,96, sondern nur 3,3. Die Ausscheidungstendenz ist geringer.

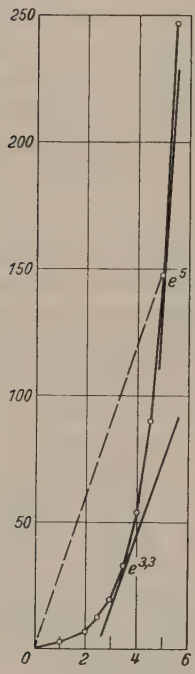


Abb. 1. Auf der Ordinate sind die Zahlenwerte für die Potenzen von e aufgetragen, auf der Abszisse die Exponenten von e. - Die „Ausscheidungstendenz" der Nieren für einen bestimmten Stoff wird durch die Steilheit der Kurve ausgedrückt, d. h. durch die jeweilige Tangente. Die maximale Ausscheidungstendenz der Nieren liegt bei e^5 (Perabrodil). Die mittlere Tendenz ist bei Punkt $e^{3,3}$ gelegen, wo die parallel zur Sehne von 0 — e^5 (gestrichelte Linie) gezogene Tangente die Kurve berührt. Um diese mittlere Ausscheidungstendenz gruppieren sich die für das Glomerulusfiltrat angenommenen Maßsubstanzen (z. B. Inulin).

Was bedeutet nun diese Zahl? Tragen wir auf einer Kurve die Werte von e^1, e^2, e^3 usw. als Ordinate und die Werte des Exponenten 1, 2, 3 usw. als Abszisse ein, so erhält man eine stark ansteigende Kurve. Hier kommt nur der Teil von null bis e^5 in Betracht, da letzterer Wert die maximale Ausscheidungstendenz darstellt. Sie wird gegeben durch die Steilheit der Kurve, also die Tangente in dem betreffenden Punkte. Die Tangente für e^5 ist außerordentlich steil. Sucht man nun nach einer mittleren Ausscheidungstendenz zwischen null und e^5, so wird die Steigung durch die Sehne von null bis zum Punkt e^5 gegeben, das ist der durchschnittliche Anstieg der Kurve. Legt man an die Kurve eine Tangente parallel zu dieser Sehne, so berührt sie die Kurve im Punkte $e^{3,3}$, also bedeutet dieser Punkt die mittlere Ausscheidungstendenz. Das heißt aber: Die Stoffe, die zur Messung des Filtrates angewandt werden, weisen eine durchschnittliche Ausscheidungstendenz auf. Man wird unwillkürlich an eine Gausssche Fehlerkurve erinnert, wo sich die Hauptmenge der Werte um einen mittleren Gipfel gruppiert; die meisten liegen sehr nahe daran und nur wenige weichen vom Gipfel nach beiden Seiten

hin ab. Es scheint also so zu sein, als gruppieren sich auch bei der Ausscheidung eine Anzahl von Substanzen mit ihrem Ausscheidungsbestreben um die Mitte der Ausscheidung und weisen eine Clearance von 135 auf. So bedeutet die Ähnlichkeit der Clearances dieser Substanzen noch keinen Beweis für ihre Filtration — ohne Sekretion und Reabsorption —, sondern stellen nur den Mittelwert der Transfereinrichtungen dar.

(*Anhang.*) Wenn man die Ausscheidung verschiedener Stoffe miteinander vergleicht, so sieht man, daß das Ausscheidungsvermögen der Niere sehr verschieden ist. Man könnte als Maß des Ausscheidungsbestrebens den Konzentrationskoeffizient, das Verhältnis von Harnkonzentration zu Plasmakonzentration, nehmen oder die Werte ihrer Clearances oder endlich den Exponenten der Ausscheidungstendenz. Ich habe solche Werte für einige Stoffe, von denen man diese Zahlen kennt, zusammengestellt; 3 körpereigene Substanzen, 2 anorganische Salze (wobei zu bedenken ist, daß Phosphat in den Stoffwechsel eingreift und nicht nur Ausscheidungssubstanz ist) und zugeführte körperfremde Stoffe, von denen PAH der körpereigenen Hippursäure nahesteht, ferner eine körperfremde organische Jodverbindung und 4 andere zum Testen benutzte Stoffe, 2 organische und 2 anorganische. — Ordnet man diese nach verschiedenen Gesichtspunkten, so ist ihre Reihenfolge jedesmal eine andere. Es liegen nach dem Konzentrationskoeffizienten 3 über dem Mittelwert und 8 unter ihm; bei der Reihenfolge nach der Größe der Clearance liegen 3 über dem Durchschnitt und 7 unter ihm. Bildet man die Reihe nach dem Exponent von *e*, den man als Maß der Ausscheidungstendenz ansehen kann, so liegen 4 darüber und 2 darunter, dagegen 5 dicht am Mittelwert; es sind die zur Bestimmung der Filtratmenge verwandten Stoffe. Wenn auch die Auswahl der Stoffe willkürlich ist, so scheint doch eine gewisse Gruppierung um einen Mittelwert bei der Ausscheidungstendenz vorzuliegen, nicht aber bei den anderen Maßstäben. Freilich liegen auch dort die Zahlen für die Testsubstanzen der Filtration nahe beieinander, aber sie entsprechen nicht dem Mittel. Vielleicht kommt einer solchen Betrachtung eine gewisse Bedeutung zu.

Konzentrations-Koeffizient		Clearance		Ausscheidungs-Tendenz	
PAH	263	PAH	713	PAH	4,95
Perabrodil	258	Perabrodil	610	Perabrodil	4,73
SO_4	90	PO_4	450	PO_4	4,71
Kreatinin	54	SO_4	245	SO_4	3,89
Thiosulfat	54	Kreatinin	138	Kreatinin	3,32
Ferrocyanid	54	Thiosulfat	138	Inulin	3,29
Inulin	50	Ferrocyanid	138	Thiosulfat	3,29
Mannit	50	Inulin	136	Mannit	3,29
U+	27	Mannit	136	Ferrocyanid	3,29
PO_4	17	U+	74	U—	1,92
U—	13	U—	34	U+	0,48
Durchschnitt	84,4		256		3,36

Man kann also eine Tendenz zur Ausscheidung durch die Niere für die verschiedenen Stoffe feststellen, wobei die zur Messung des Plasmadurchflusses dienenden Substanzen PAH und Perabrodil die höchste

Ausscheidungstendenz zeigen. Die als Maß der Filtration angesehenen Stoffe weisen eine durchschnittliche Ausscheidungstendenz auf und gruppieren sich um die Stoffe Inulin und Mannit; dies ist ein Zeichen für einen Mittelwert der Ausscheidungstendenz, für eine mittlere Tätigkeit der Transfereinrichtungen bei diesen Stoffen, nicht aber ein Beweis ihrer Ausscheidung lediglich durch Filtration.

Literatur.

[1] Poulsson, L. T.: J. of Physiol. **69**, 411 (1930). — [2] Oliver, J., s. S. E. Bradley: Transact. first Conf. Okt. 1949, Josiah Macy jr. Foundation, New York. — [3] Gukelberger, M.: Arch. klin. Med. **189**, 496 (1942). — [4] Eggleton, M. G., and Y. A. Habib: Nature **163**, 1000 (1949). — [5] van Slyke, s. Möller, McIntosh and van Slyke: J. Clin. Invest. **6**, 427, 485 (1928). — [6] Frey, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **115**, 621 (1932). — [7] Dean, R. F., and R. A. McCance: J. of Physiol. **109**, 80 (1949). — [8] Barclay, J. A., W. Cooke u. G. de Muralt: Acta med. scand. (Stockh.) **139**, 267 (1950). — [9] Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 718 (1947). — [10] Marshall, E. K., and J. L. Vickers: Bull. Hopkins Hosp. **34**, 1 (1923). — [11] West, C. D., and S. Rapoport: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **71**, 322 (1949). — [12] Frey, E.: Klin. Wschr. **1937/I**, 289. — [13] Richards, A. N., and C. Schmidt: Amer. J. Physiol. **59**, 489 (1922). — [14] Cushny, A. R.: Die Absonderung des Harnes. Jena: Fischer 1926. — [15] Gottlieb, R., u. R. Magnus: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **45**, 223 (1901). — [16] Reid, W. L.: Amer. J. Physiol. **90**, 157 (1929). — [17] Frey, E.: Arch. f. Physiol. **177**, 157 (1917). — [18] Michaelis u. Maass: Biochem. Z. **4**, 542; **5**, 1 (1907). — [19] Smith, H. W.: The kidney. New York: Oxford University Press. 1951. — [20] Frey, J., u. W. Schmidt, s. Diss. W. Schmidt, Freiburg i. Br. 1951.

Dr. med. Ernst Frey, emer. o. Professor der Pharmakologie der Universität Göttingen, Freiburg i. Br., Lugostraße 2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 447—450 (1952).

Aus dem Pathophysiologischen Laboratorium der Universitäts-Nervenklinik Würzburg (ehemaliger Direktor: Prof. Dr. J. Zutt).

Die antagonistische Wirkung von Monojodessigsäure und Desoxycorticosteronacetat auf die Farbstoffphagocytose der Rattenleukocyten.

Von

V. Köhler und R. Bauer.

(Eingegangen am 16. November 1951.)

Die an neutrophilen Leukocyten in vitro gefundene Hemmung der Farbstoffphagocytose durch Stoffwechsel- bzw. Zellgifte[1] macht wahrscheinlich, daß außer einer Änderung physikalischer Oberflächeneigenschaften der Blutzellen[2] auch Prozesse des leukocytären Stoffwechsels an der Phagocytose teilnehmen. Ihre wesentliche Beeinträchtigung durch Monojodessigsäure oder Natriumfluorid weist in Analogie zu den am Muskelstoffwechsel gemachten Feststellungen insbesondere auf die Bedeutung der anaeroben Glykolyse für den biologischen Ablauf dieser Funktion hin[1, 3].

Nach den Beobachtungen von Verzár u. Mitarb.[4] vermag das synthetische Nebennierenrindenhormon Desoxycorticosteron-(Acetat = DCA) die durch Monojodessigsäure und Natriumfluorid verursachten Störungen auszugleichen. Das trifft auch für die Schädigung der Phagocytose in vitro[3] zu.

Nunmehr soll untersucht werden, inwieweit die neutrophilen Leukocyten von Ratten durch chronische Jodacetat-Vergiftung ihr Vermögen zu phagocytieren (in vivo) verlieren und in welchem Ausmaß eine Behandlung mit Desoxycorticosteron antagonistisch wirkt.

Methodik.

Die Phagocytose-Versuche wurden an 42 Ratten mit dem Farbstoff Carmin[1, 3] (M. Huber, Farbenfabriken München) durchgeführt. Das Blut entstammt der Aorte nach Tötung der Tiere.

Jeweils 1 cm³ des mechanisch defibrinierten Blutes wurde im Reagensglas mit 5 mg Carmin versetzt und bei einer Raumtemperatur von 20° C in einer Schüttelmaschine mit 60 Arbeitsgängen in der Minute gemischt. Die nach 30 min gemachten Ausstriche wurden nach Giemsa und May-Grünwald gefärbt. Bei der Auszählung der Präparate (100—300 neutrophile Leukocyten) galt der neutrophile Leukocyt als phagocytose-positiv, der Carmin mit Sicherheit enthielt. Die einzelnen in der Tabelle aufgeführten Werte stellen das Mittel aus 6 Präparaten dar. Die Phagocytose-Positivität der neutrophilen Leukocyten wird in Prozenten angegeben. 10 Tiere waren Kontrollen (A), 25 Tiere wurden mit Monojodessigsäure vergiftet

(B), 7 Tiere wurden ebenfalls mit Monojodessigsäure vergiftet, erhielten aber Desoxycorticosteronacetat (C). Die Monojodessigsäure wurde in wäßriger Lösung (10 mg pro 100 g Körpergewicht) täglich subcutan für eine Zeit von 7 Tagen zugeführt. Die Tagesdosis entspricht etwa der der in der Muskelphysiologie angewandten Konzentration. Die Behandlung mit Desoxycorticosteronacetat (Percorten-Öl, Ciba-A.-G.) begann 2 Tage vor der Monojodessigsäure-Vergiftung und dauerte bis zur Tötung der Tiere. Die Tagesdosis betrug 5 mg pro Tier.

Versuchsergebnisse.

In der beistehenden Tabelle sind die Ergebnisse aller Phagocytose-Versuche (A, B, C) wiedergegeben. Danach phagocytieren die neutrophilen Leucocyten der Normaltiere (A) Carmin durchschnittlich zu

Tabelle 1.

Der Einfluß des DCA auf die durch Jodacetat gestörte Phagocytose in vivo.

Phagocytose in Prozent			
A: Normal-Tiere	B: Jodacetat-Tiere		C: Jodacetat + DCA-Tiere
Nr. 1: 45%	Nr. 1: 14%	Nr. 14: 11%	Nr. 1: 49%
2: 44	2: 12	15: 15	2: 48
3: 39	3: 14	16: 17	3: 33
4: 42	4: 8	17: 11	4: 30
5: 40	5: 14	18: 14	5: 28
6: 46	6: 11	19: 10	6: 30
7: 54	7: 10	20: 13	7: 37
8: 44	8: 12	21: 13	
9: 41	9: 13	22: 17	
10: 44	10: 16	23: 9	
	11: 15	24: 8	
	12: 8	25: 16	
	13: 17		
M: 43,9%+1,3	Mittelwert: 12,7%+0,56		M: 36,4%+3,6

43,9%. Diese Quote wird von den mit Monojodessigsäure chronisch vergifteten (B) nicht erreicht. Sie beträgt lediglich 12,7%. Die Differenz ist signifikant. Die zusätzlich mit DCA chronisch behandelten Ratten (C) weisen mit 36,4% im Mittel annähernd die Werte der Kontrollen (A) auf.

Diese Resultate entsprechen den bereits in vitro gemachten Feststellungen[3].

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die toxischen Wirkungen der Monojodessigsäure wurden vor allem am Kohlehydrat-Stoffwechsel studiert[5]. Von großer Bedeutung für den funktionellen Stoffwechsel erwies sich die Blockierung der Triosephosphat-Dehydrierung, die die Milchsäurebildung und des weiteren die funktionell wichtige Resynthese von Kreatin-Phosphorsäure und Adenosintriphosphorsäure unterbindet[5, 6]. Mit der Feststellung von Glykogen

im neutrophilen Leukocyten[7, 8], zu dem in der Größenordnung der Muskelfaser[8] ergibt sich die Voraussetzung für einen derartigen Effekt der Monojodessigsäure. Das Glykogen, das der Leukocyt sowohl aufbauen als auch glykolytisch abbauen[7] sowie phagocytieren[8] kann, scheint dessen verschiedenen Funktionen zu dienen. So wird die Phagocytosefähigkeit des funktionierenden Leukocyten durch Zucker gesteigert[6]. Die Eiterzelle vermag dagegen Zucker nicht mehr zu verwerten[10]. Sie ist auch außerstande zu phagocytieren[13]. Diese Verhältnisse legen nahe, daß die Monojodessigsäure als Stoffwechselgift den intraleukocytären Kohlehydratstoffwechsel stört und so die motorischen Eigenschaften des neutrophilen Leukocyten hemmt bzw. vernichtet.

Nach früheren Untersuchungen beeinträchtigt Monojodessigsäure auch die Wanderungsfähigkeit der Leukocyten in eine entzündlich gereizte Cornea[11]. Danach mag es nicht irrtümlich sein, den neutrophilen Leukocyten als motorische Zelle anzusehen, der seine Betriebsenergie in erster Linie aus dem Kohlenhydratstoffwechsel bezieht[1, 3]. R. Wagner[8] (1947) äußerte die Ansicht, daß der myeloische Leukocyt als motorische Zelle Glykogen ins Gewebe transportiere. Die Vergiftungsversuche scheinen darüber hinaus zu zeigen, daß das Glykogen für funktionelle Prozesse und Strukturbewahrung (Riesser[12]) des neutrophilen Leukocyten notwendig ist.

Es ist bemerkenswert, daß die positive Korrelation zwischen der Motilität der Spermie und Fructolyse nachgewiesen wurde[13, 14]. Die normale Spermie vermag die vorhandene Fructose im Gegensatz zur pathologischen, bewegungslosen Zelle völlig aufzuzehren[14]. Die Fructose stellt das physiologische Energiesubstrat dar[14]. Danach ist es möglich, daß die bereits von Ehrlich[15] beschriebene Vermehrung des Glykogens in geschädigten, noch lebenden Leukocyten teilweise auf einem verminderten Verbrauch, der Funktionsstörungen verursacht, beruht.

Der nahezu maximale Schutz des neutrophilen Leukocyten gegenüber chronischer Vergiftung mit Monojodessigsäure darf ebenfalls im Sinne einer Stoffwechseleinwirkung des Steroids auf den Leukocyten gedeutet werden. Sie tritt auch in vitro ein[3]. Ferner ist NaCl unfähig, Desoxycorticosteron in dieser Hinsicht zu ersetzen[3]. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß DCA hier nicht in der Eigenschaft als Mineralocorticoid wirksam ist. Nach unveröffentlichen Untersuchungen[17] beeinflußt Desoxycorticosteron Fermente. Beispielsweise vermag es die Dehydrasenaktivität der isolierten Cornea zu steigern. Dieser Befund läßt mit einem Stoffwechseleffekt des Desoxycorticosteron in Unabhängigkeit der sogenannten hormonellen Hypophysektomie[16] rechnen.

Die Versuche lassen also annehmen, daß die im Leukocyten sich abspielenden Stoffwechselvorgänge bei der Phagocytose eine bedeutende Rolle spielen. Die Fähigkeit zur Phagocytose setzt offenbar einen intakten Kohlehydratumsatz voraus. Die Phagocytose ist wohl ein wesentlich komplizierterer Vorgang, als es nach der rein physikalischen Betrachtungsweise den Anschein hat.

Zusammenfassung.

Nach chronischer Vergiftung der Ratte mit Monojodessigsäure geht die Phagocytosefähigkeit der neutrophilen Leukocyten beträchtlich zurück. Behandlung mit Desoxycorticosteron verleiht der Ratte einen nahezu völligen Schutz gegen eine derartige Giftwirkung der Monojodessigsäure. Die Untersuchungen legen nahe, im neutrophilen Leukocyten eine motorische Zelle zu sehen, die ihre wesentlichen Betriebsenergien aus dem Kohlenhydratumsatz beziehen.

Literatur.

[1] Köhler, V., R. Bauer u. H. Müller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 214 (1951). — [2] Mudd u. Mitarb.: Physiologic. Rev. **14**, 2104 (1934). — [3] Köhler, Bauer u. Müller: Endokrinol. **26**, 5/6, 253 (1949). — [4] Verzár: Funktion der Nebennierenrinde. Basel 1939. — [5] Lundsgaard: Biochem. Z. **217**, 162 (1930); **220**, 1, 8 (1930); **250**, 61 (1932). — [6] Lehnartz: Chem. Physiologie, 4. Aufl. Berlin: Springer 1940. — [7] Willstätter u. Rodenwald: Z. physiol. Chem. **247**, 115 (1937). — [8] Wagner, R.: Blood (Am.) **2**, 235 (1947). — [9] Tunnicliff: J. Inf. Dis. **48**, 161 (1931). — [10] Müller: Diss. Würzburg 1951 (Lit.). — [11] Köhler u. Scharf: Ärztl. Wschr. **43**, 854 (1950). — Med. Mschr. **2**, 13 (1951). — Klin. Wschr. **3/4**, 60 (1951). — [12] Riesser: Helvet. Med. Acta **9**, 6 (1942). — [13] Mann: Lancet **254**, 446 (1928). — [14] Eichenberger u. Goossens: Schweiz. med. Wschr. **40**, 1073 (1950). — [15] Ehrlich, zit. bei: Schmaus-Herxheimer: Grundriß d. Path. Anatomie, 20. Aufl. München: Bergmann 1932. — [16] Cheng and Sayers: Endocrinology **44**, 400 (1949). — [17] Köhler, V.: Ärztl. Wschr. **4**, 84 (1952).

Dr. V. Köhler, Würzburg, Am Galgenberg 22.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 451—454 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser).

Methylthiouracilwirkung und Dijodtyrosin.

Von
Gisela Hess und Rudolf Kopf.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Januar 1952.)

Der therapeutische Wert des Thiouracilabkömmlings *4-Methyl-2-thiouracil* liegt bekanntlich darin, daß es durch Blockierung der Hormonsynthese in der Schilddrüse den Sauerstoffverbrauch des Organismus senkt und somit thyreogene Stoffwechselsteigerungen wieder normalisieren kann. Obwohl die Bildung von Schilddrüsenhormon durch 4-Methyl-2-thiouracil eingeschränkt bzw. aufgehoben ist, zeigt die Drüse selbst das typische Bild des aktiven Organs: ihre Größe hat zugenommen, die Durchblutung ist gesteigert, das Epithel ist zylindrisch, zum Teil mehrschichtig, das Follikellumen ist frei von anfärbbarem Kolloid. Nach der heute allgemein herrschenden Ansicht über die Wirkungsweise schwefelhaltiger antithyreoidaler Substanzen liegt die Ursache für die strukturelle Umformung der Drüse in einer gegenregulatorischen Leistung des Hypophysenvorderlappens: der Organismus versucht, dem im Blute vorhandenen Mangel an Schilddrüsenhormon durch vermehrte Abgabe von thyreotropem Hormon entgegenzuwirken[5]. Die Ausbildung der in der Schilddrüse auftretenden reaktiven Veränderungen muß sich daher verhindern lassen, wenn das einwirkende 4-Methyl-2-thiouracil mit Stoffen kombiniert wird, welche die Tätigkeit der Hypophyse mehr oder weniger hemmen. Wie frühere Untersuchungen ergeben haben, schwächen sowohl 4,4′-Dioxy-α,β-diäthylstilben-dipropionat (Cyren B) als auch Dijodtyrosin die durch 4-Methyl-2-thiouracil verursachten Schilddrüsenveränderungen ab, ohne daß die sonst nach Verabfolgung der antithyreoidalen Substanz übliche Abnahme des Sauerstoffverbrauches beeinträchtigt wird[4].

Die Wirkung des Dijodtyrosins tritt zuverlässig ein, denn sie läßt sich auch bei Wiederholung des Versuches bestätigen: je 12 weißen Ratten (männliche und weibliche, 150—230 g) wurde für die Dauer von 20 Tagen einmal täglich 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil bzw. 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil und zusätzlich 0,05 g Dijodtyrosin in Substanz, suspendiert in jeweils 10,0 cm^3 Wasser, je Kilogramm Körpergewicht per os (Schlundsonde) zugeführt. In beiden Fällen sank der Sauerstoffverbrauch um etwa 30% unter den gleich 100 gesetzten mittleren Ausgangswert ab

(Abb. 1). Nach alleiniger Zufuhr von 4-Methyl-2-thiouracil wogen die Schilddrüsen am 21. Versuchstag im Mittel 24,3 ± 1,16 mg und wiesen Zeichen einer starken Aktivierung auf, nach der kombinierten Behandlung betrug das Schilddrüsengewicht zu demselben Zeitpunkt 17,1 ± 2,18 mg je 100 g Ratte, ihr histologisches Aussehen war nahezu normal.

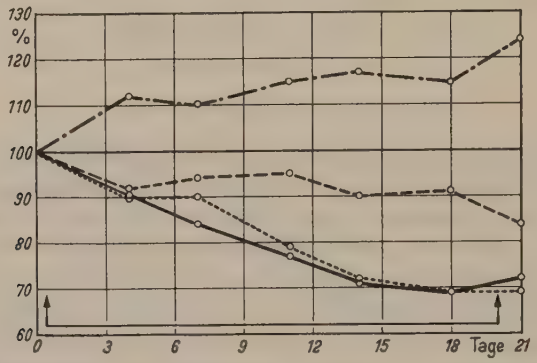


Abb. 1. Sauerstoffverbrauch von Ratten bei täglicher Einwirkung von 4-Methyl-2-thiouracil bzw. 4-Methyl-2-thiouracil und zusätzlich Dijodtyrosin als wäßrige Suspension oder in alkalischer Lösung. Abszisse: Zeit in Tagen. Ordinate: Sauerstoffverbrauch in % des mittleren (= 100 gesetzten) Ausgangswertes. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert von je 12 Tieren, die Pfeile geben die Dauer der Behandlung an.

. . . . . 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil, suspendiert in 10,0 cm³ Wasser per os.
——— 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil und zusätzlich 0,05 g Dijodtyrosin, suspendiert in je 10,0 cm³ Wasser per os.
– – – 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil, suspendiert in 10,0 cm³ Wasser, und zusätzlich 0,05 g Dijodtyrosin, in Alkali gelöst und mit Wasser auf 10,0 cm³ aufgefüllt, per os.
— · — 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil, suspendiert in 10,0 cm³ Wasser, per os und zusätzlich 0,05 g Dijodtyrosin, in Alkali gelöst und mit Wasser auf 2,5 cm³ aufgefüllt, subcutan je Kilogramm Körpergewicht.

Andererseits wurde die Beobachtung gemacht, daß Dijodtyrosin, zusammen mit 4-Methyl-2-thiouracil gegeben, wohl die reaktiven Veränderungen in der Schilddrüse unterdrückt, gleichzeitig aber die Abnahme des Sauerstoffverbrauches verhütet[9]. Auch diese Befunde lassen sich bestätigen, allerdings nur dann, wenn das in Wasser praktisch unlösliche Dijodtyrosin in Alkali gelöst verwendet wird.

Je 12 weiße Ratten (männliche und weibliche, 120—230 g) erhielten für die Dauer von 20 Tagen täglich 0,05 g Dijodtyrosin in alkalischer Lösung per os bzw. 0,05 g Dijodtyrosin in alkalischer Lösung per os und zusätzlich 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil per os oder 0,05 g Dijodtyrosin in alkalischer Lösung subcutan bzw. 0,05 g Dijodtyrosin in alkalischer Lösung subcutan und zusätzlich 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil per os je Kilogramm Körpergewicht.

Die Lösung von Dijodtyrosin (Natronlauge) wurde einmal — etwa 14 Tage vor Beginn des Versuches — hergestellt, 4-Methyl-2-thiouracil täglich frisch in Wasser suspendiert. Die Lösungen waren so eingestellt, daß die Tiere bei oraler Verabreichung 10,0 cm³, bei subcutaner Zufuhr 1,0 cm³ pro Kilogramm Körpergewicht erhielten. Die Substanzen wurden den Tieren einmal täglich vormittags

per os mit der Schlundsonde bzw. subcutan unter die Rückenhaut verabfolgt. Trinkwasser — Leitungswasser — und Standardfutter — Hartgebäck aus 42,4% Maismehl, 33,2% Haferflocken, 8,2% Trockenhefe, 11,1% Trockenmagermilch, 2,2% Lebertran und 1,1% Salzgemisch nach McCollum und Simmonds — standen ad libitum zur Verfügung. Der Sauerstoffverbrauch der Versuchstiere wurde im wesentlichen nach der von Loeser, Ruland und Trikojus[8] angegebenen Methode bestimmt und wie in früheren Arbeiten[5,6] ausgewertet.

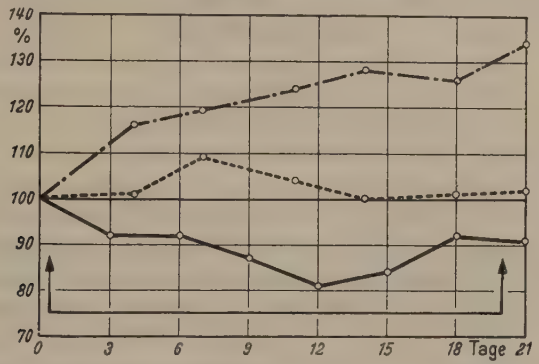


Abb. 2. Sauerstoffverbrauch von Ratten bei täglicher Einwirkung von Dijodtyrosin als Suspension oder in alkalischer Lösung. Abszisse: Zeit in Tagen. Ordinate: Sauerstoffverbrauch in % des mittleren (= 100 gesetzten) Ausgangswertes. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert von 11 bzw. 12 Tieren, die Pfeile geben die Dauer der Behandlung an.

——— 0,05 g Dijodtyrosin, suspendiert in 10,0 cm³ Wasser, per os.
— — — 0,05 g Dijodtyrosin, in Alkali gelöst und mit H_2O auf 10,0 cm³ aufgefüllt, per os.
— · — 0,05 g Dijodtyrosin, in Alkali gelöst und mit Wasser auf 2,5 cm³ aufgefüllt, subcutan je Kilogramm Körpergewicht.

Die in diesen Versuchen gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß die Wirkung von Dijodtyrosin weitgehend davon abhängt, ob die Substanz als wäßrige Suspension oder in alkalischer Lösung verabreicht wird. Nach oraler Zufuhr einer wäßrigen Dijodtyrosin-Suspension wird, wie bereits erwähnt, die durch 4-Methyl-2-thiouracil verursachte Senkung des Sauerstoffverbrauches nicht beeinflußt, nach Verabfolgung einer Lösung von Dijodtyrosin in Alkali dagegen abgeschwächt. Die Unterschiede werden noch deutlicher, wenn die alkalische Dijodtyrosinlösung subcutan verabfolgt wird. In diesem Falle wird die Senkung des Sauerstoffverbrauches nicht nur vermindert oder aufgehoben, sondern die Sauerstoffverbrauchswerte erfahren sogar eine deutliche Steigerung über die Norm (Abb. 1).

In gleiche Richtung weisen Befunde bei Verwendung von Dijodtyrosin (0,05 g/kg) allein. In Wasser suspendiert senkt es den Stoffwechsel, in Alkali gelöst wird er per os angedeutet, bei subcutaner Injektion eindeutig gesteigert (Abb. 2). Das Gewicht der Schilddrüsen ist in allen Fällen normal, das anatomische Bild des Organs normal, gelegentlich ruhig, nach subcutaner Verabfolgung sehr ruhig.

Die mitgeteilten Befunde sind leicht zu deuten, wenn man sich an die Beobachtungen von Astwood[1] und Mackenzie[10] erinnert, die bei ihren grundlegenden Untersuchungen über die Wirkungsweise antithyreoidaler Schwefelverbindungen bereits festgestellt haben, daß sich die durch Sulfaguanidin oder 2-Thiouracil verursachte Abnahme des Sauerstoffverbrauches durch Zufuhr von Thyroxin abschwächen oder aufheben läßt. Erinnert man sich weiterhin an die Tatsache, daß nach den Untersuchungen von v. Mutzenbecher[11] beim Stehenlassen einer alkalischen Dijodtyrosin-Lösung unter geeigneten Bedingungen — Lösung der Substanz in einem Äquivalent Natronlauge oder mehr[2], erhöhte Temperatur, Wartezeit 1—2 Wochen — aus Dijodtyrosin Thyroxin entsteht, so liegt der Gedanke nahe, daß die Wirkung der Dijodtyrosin-Suspension auf dem in ihr unverändert enthaltenen Dijodtyrosin beruht, die Wirkung der alkalischen Dijodtyrosin-Lösung dagegen von ihrem jeweiligen Gehalt an Thyroxin oder ähnlichen stoffwechselwirksamen Substanzen abhängig ist, die sich, begünstigt durch Alterung, Temperatur, Alkalität u. a. m., in der Lösung gebildet haben können.

Auf die Nichtbeachtung dieser Dinge dürften sicherlich gelegentliche Widersprüche zurückzuführen sein, die in klinischen und experimentellen Untersuchungen bei Verwendung von Dijodtyrosin beobachtet wurden. Es ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert, daß sich in alkalischen Lösungen von Dijodtyrosindinatrium allein analytisch kein Thyroxin nachweisen ließ[7]. Möglicherweise sind die hier entstehenden Mengen so klein, daß sie nur mit biologischen Methoden erfaßt werden können.

Die mitgeteilten Befunde beweisen erneut, daß — wie bereits oft betont wurde[3, 6] — zur Beurteilung von Substanzen, welche auf das System Hypophyse-Schilddrüse einwirken, nicht nur die anatomischen Veränderungen in der Schilddrüse, sondern auch andere Kriterien, beispielsweise Stoffwechseländerungen, herangezogen werden müssen.

Literatur.

[1] Astwood, E. B., J. Sullivan, A. Bissell and R. Tyslowitz: Endocrinology **32**, 210 (1943). — [2] Block jr., P.: J. of Biol. Chem. **135**, 51 (1940). — [3] Glock, G. E.: Brit. J. Pharmacol. a. Chemother. **1**, 127 (1946). — [4] Kopf, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 58 (1950). — [5] Kopf, R., A. Loeser u. G. Meyer: Dtsch. med. Wschr. **1948**, 512. — [6] Kopf, R., A. Loeser u. G. Meyer gemeinsam mit Bielig, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 256 (1949). — [7] Kraft, K., u. F. Dengel: Z. physiol. Chem. **272**, 147 (1942). — [8] Loeser, A., A. Ruland u. V. M. Trikojus: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **189**, 664 (1938). — [9] Lorenz, D.: Diskussionsbemerkung, Verh. dtsch. pharmak. Ges., Mainz 1951. — [10] Mackenzie, J. B., and C. G. Mackenzie: Endocrinology **32**, 185 (1943). — [11] Mutzenbecher, P. v.: Z. physiol. Chem. **261**, 253 (1939).

Priv.-Dozent Dr. Rudolf Kopf, Münster i. W., Pharmakol. Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 455—463 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. Lendle).

Untersuchungen über die Blutdrucksenkung nach d-Tubocurarin und die antagonistische Wirkung von Prostigmin.

Von
W. D. Erdmann und H. Mercker.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. November 1951.)

Bei der Anwendung von d-Tubocurarin (dTC) können Blutdrucksenkungen auftreten, deren Entstehungsmechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist. Im Versuch am narkotisierten Tier bewirken schon Dosen, die im Bereich der einfachen bis doppelten Head-drop-Dosis (0,15—0,3 mg/kg) liegen, starke Erniedrigungen des arteriellen Druckes.

Als Ursachen kommen in Frage:

1. Die Histaminfreisetzung aus dem Gewebe durch dTC (namentlich aus Leber und Skeletmuskulatur), welche von Alam, Anrep, Barsoum, Talaat und Wieninger[1], Reid[19], Feldberg und Paton[9] nachgewiesen und von Grob, Lilienthal und Harvey[11] sowie von Landmesser[17] zur Erklärung für die Kreislaufwirkungen von dTC herangezogen wurde.
2. Rückwirkungen der allgemeinen Muskelerschlaffung auf den Kreislauf, was von Guyton und Reeder[12] als wahrscheinlich angenommen wurde.
3. Die Blockung der sympathischen Synapsen, welche von Brown und Feldberg[4] und Guyton und Reeder[12] beschrieben, und die von Heymans[14] und van den Ostende[21] als Ursache für die Kreislaufwirkungen des dTC angesehen wurde.
4. Die von Bean und Elwell[2] beschriebene gefäßerweiternde Wirkung des dTC, welche bei seitenständiger Infusion in die Art. femoralis im Tierexperiment beobachtet wurde.

Im Verlauf unserer Untersuchungen über die Kreislaufwirkung des dTC machten wir die Beobachtung, daß Prostigmin eine blutdrucksteigernde Wirkung während der Blutdrucksenkung nach dTC hat, und daß durch vorherige Prostigmingabe die Wirkung des dTC auf den Blutdruck abgeschwächt oder aufgehoben wird. Dieser Befund steht im Gegensatz zu einer Beobachtung von Guyton und Reeder[12], die bei ihren Untersuchungen über die Wirkung des dTC auf das vegetative Nervensystem keine Kreislaufwirkung von Neostigmin (= Prostigmin) bei starken Blutdrucksenkungen nach dTC sahen. Es erschien uns daher erforderlich, die Bedingungen einer antagonistischen Wirkung des Prostigmins auf die Blutdrucksenkung nach dTC experimentell näher zu untersuchen.

Methodik.

Die Versuche wurden an 19 Hunden, 21 Katzen und 1 Kaninchen in Urethan-Narkose (1,5—2,0 g/kg), in Morphin-Urethan-Pernocton-Narkose (Morphin 2,0 mg/kg, Urethan 0,5 g/kg, Pernocton* 40,0 mg/kg) oder in Chloralose-Urethan-Narkose (Chloralose 0,08 g/kg, Urethan 0,25 g/kg) mit und ohne Pernoctonzusatz (von 20,0 mg/kg) durchgeführt.

Gemessen wurden: 1. Der arterielle Blutdruck in der Art. brachialis oder Art. femoralis mit dem Wismutmanometer[13] und photographischer Registrierung, 2. Die Durchblutung einer Vena femoralis mit der Reinschen Thermostromuhr[20], 3. Die Kontraktion der Katzennickhaut bei prä- und postganglionärer Reizung. Die Reizung wurde mit dem Megatest nach Kroebel[16] oder mit einem Induktorium durchgeführt. Bei Verwendung des Reizgerätes betrugen die Flußzeit des Einzelimpulses 3 msec, die Impulsfolgefrequenz zwischen 2 und 50/sec, die Reizstromintensität 3 mA. Bei Verwendung des Induktoriums betrug die Impulsfolgefrequenz 1/sec. Die Reizung war entweder eine kontinuierliche, oder es wurde mit einem Abstand von je 2 min für je 10 sec gereizt. Die Kontraktionen der Nickhaut wurden photoelektrisch registriert. Die Vergrößerung der Ausschläge war dabei 1 : 50.

Folgende Präparate wurden bei den Versuchen benutzt: d-Tubocurarin „Roche", d-Tubocurarin „HAF", WS 896, WS 897 und WS 898 (= drei Versuchspräparate der Firma Boehringer-Mannheim, die aus Calebassencurare gewonnen wurden), Prostigmin „Roche"**, Histamin „Imido-Roche"***. Die Substanzen wurden als intravenöse Injektionen oder als Dauerinfusionen nach der Methode von Hoffmann und Witte[15] verabreicht. Die Versuchstiere wurden während der ganzen Dauer des Versuches künstlich beatmet.

Befunde.

1. Die Abb. 1 zeigt eine typische Blutdrucksenkung nach intravenöser Stoßinjektion von dTC (0,2 mg/kg) und die antagonistische Wirkung des Prostigmin. Nach initialen kleinen Blutdrucksenkungen oder auch -steigerungen kommt es im allgemeinen nach dTC zu nachhaltiger Blutdrucksenkung um etwa 60 mm Hg. Der Blutdruck kehrt meist nach 20—30 min zur Norm zurück. In derselben Zeit pflegt bei dieser Dosierung auch die Skeletmuskellähmung abzuklingen. Die periphere Durchblutung zeigt häufig eine initiale Zunahme und eine darauffolgende Minderdurchblutung, wobei letztere druckpassiv bedingt ist. Mit Rückkehr des Blutdruckes zur Norm kehrt auch die Durchblutung auf ihren ursprünglichen Wert zurück. Während der Blutdrucksenkung treten keine wesentlichen Pulsfrequenzänderungen auf, was an sich kreislaufregulatorisch zu erwarten wäre. Bei Tieren, die stark von der Norm abweichende Werte des Ausgangsblutdruckes (über 150 mm Hg oder unter 60 mm Hg) zeigten, sahen wir selten wesentliche Blutdruckwirkungen von dTC. Nach Prostigmin (0,1 mg/kg) tritt innerhalb 30—60 sec eine deutliche und

---

* = sec-Butyl-β-bromallyl-malonylureid-Natrium.

** Dimethylcarbaminsäureester des m-Oxyphenyltrimethyl-ammonium-methylsulfats.

*** Wir danken den Herstellerfirmen für die Überlassung der Versuchssubstanzen.

anhaltende Blutdrucksteigerung ein, die peripher mit einer weiter anhaltenden Minderdurchblutung verbunden ist. Dies spricht für eine Vasokonstriktion.

Während der Dauerinfusion von Prostigmin in einer Dosierung von 0,01 mg/kg-min tritt nach dTC keine Blutdrucksenkung und keine Änderung in der peripheren Durchblutung ein. Die Pulsfrequenz, die während

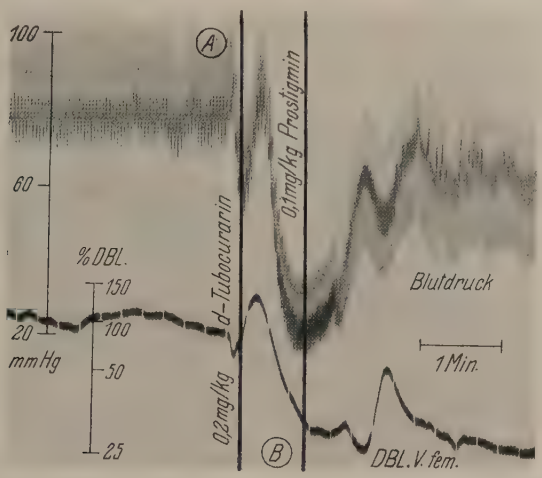


Abb. 1. Versuch vom 31. 7. 1951. Hund. Gewicht 7,0 kg. Narkose: Morphin-Pernocton-Urethan. Blutdruck in der Art. brachialis. Durchblutung der V. femoralis mit REINscher Thermostromuhr. Änderung der Durchblutung in % der Ruhedurchblutung (= 100%). Bei *A* Injektion von 0,2 mg/kg dTC i. v., bei *B* Injektion von 0,1 mg/kg Prostigmin i. v. Aufhebung der Blutdrucksenkung nach dTC durch Prostigmin.

solcher Prostigmindauerinfusionen oft erniedrigt ist, wird durch dTC nicht verändert.

2. Da in der Literatur Histaminfreisetzung durch dTC als Ursache der Blutdrucksenkung diskutiert wird[1, 19, 9, 11, 17], haben wir vergleichsweise untersucht, wie sich die Blutdrucksenkung nach Histamin unter Prostigmindauerinfusion verhält. Wir fanden, daß die Histaminwirkung auf den Blutdruck durch Prostigmin sicher nicht aufgehoben, eher etwas verstärkt wird (Abb. 2a u. b). Es verhalten sich also Blutdrucksenkung nach Histamin und nach dTC während einer Prostigmindauerinfusion gänzlich verschieden.

Wir prüften weiter die Wirkung von dTC auf den Blutdruck des Kaninchens, da nach MAUTNER und PICK[18] Histamin am Kaninchen eine Blutdrucksteigerung bewirkt. Wenn die Histaminfreisetzung für die Blutdruckwirkung des dTC von wesentlicher Bedeutung ist, sollte man am Kaninchen eine Blutdrucksteigerung erwarten. Wir sahen aber eine Blutdrucksenkung von 90 auf 10 mm Hg. Prostigmin (0,05 mg/kg) brachte den Blutdruck innerhalb 1 min wieder auf sein Ausgangsniveau zurück.

3. Von Guyton und Reeder[12] wird die Möglichkeit erwogen, daß die allgemeine Muskelerschlaffung bei Curarisierung auf dem Umweg über die Beeinflussung des venösen Rückstroms zur Blutdrucksenkung führen kann. Gegen die Richtigkeit dieser Annahme sprechen Befunde mit Muskelrelaxantien, die keine Blutdrucksenkung bewirken, z. B. mit Flaxedil[21]. Wir haben diese Frage mit Versuchspräparaten, die Calebassencurare enthielten, geprüft und fanden, daß diese Präparate bis

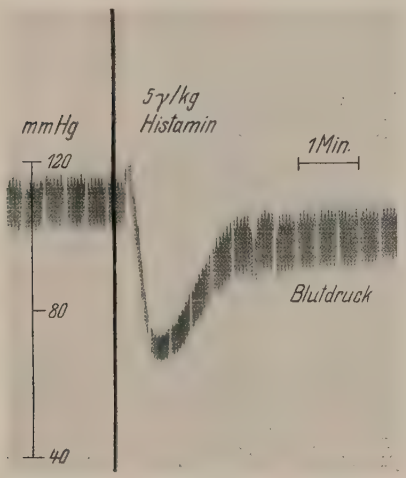


Abb. 2a

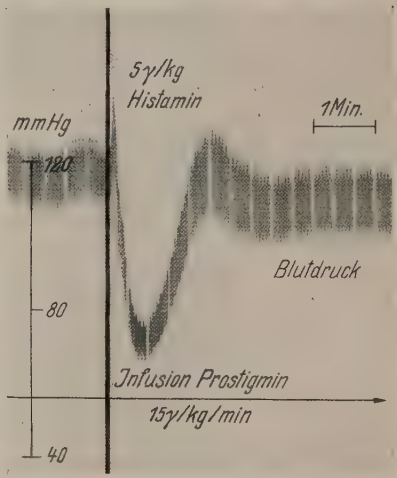


Abb. 2b.

Abb. 2a und 2b. Versuch vom 2. 8. 1951. Katze. Gewicht 3,0 kg. Narkose: Pernocton-Urethan. Blutdruck in der Art. femoralis. Abb. 2a: Blutdrucksenkung nach 0,005 mg/kg Histamin. Abb. 2b: Blutdrucksenkung nach 0,005 mg/kg Histamin während Prostigmindauerinfusion (0,015 mg/kg · min).

zum Zwanzigfachen der Head-drop-Dosis keine Blutdrucksenkung hervorriefen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Waser[22], der die Blutdruckwirkungen von Calebassencurarinen untersuchte. Die Versuche zeigen, daß die Blutdruckwirkung von Curarepräparaten offensichtlich unabhängig von der muskelerschlaffenden Wirkung auftritt.

4. Die experimentelle Prüfung des ganglionären Angriffes von dTC und die antagonistische Wirkung des Prostigmin am Ganglion ergab, daß die Funktion des oberen Halsganglions der Katze durch Dosen von 0,2 mg/kg dTC abgeschwächt wird, und zwar sowohl bei Chloralose-Urethan-Narkose wie bei Narkosekombination mit einem Barbitursäurederivat (Pernocton). Zweimalige Gaben von jeweils 0,05 mg/kg Prostigmin i. v. brachten Blutdruck und Nickhautkontraktion wieder auf das Ausgangsniveau zurück (Abb. 3).

Bei postganglionärer Reizung der Nickhaut wird die Kontraktion auch in dreimal höherer Dosierung von dTC nicht beeinflußt. Prostigmin

allein hatte in den von uns angewandten Dosierungen (0,05—0,3 mg/kg) keine Eigenwirkung auf das Ganglion und keine direkte Wirkung auf die Nickhaut. Die Prostigmineigenwirkung auf den Blutdruck ist gering. Man sieht bei Einzelinjektionen (0,05—0,1 mg/kg) geringe Steigerungen, bei höheren Dosen leichte Senkungen.

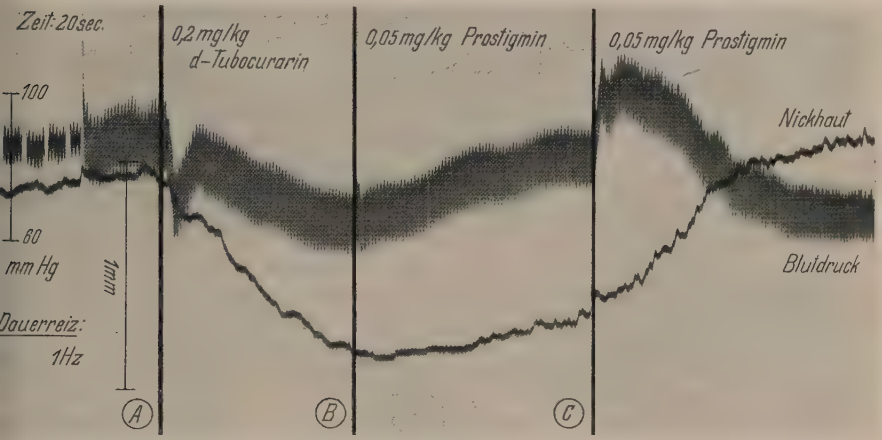


Abb. 3. Versuch vom 27. 10. 1951. Katze. Gewicht 3,1 kg. Narkose: Chloralose-Pernocton-Urethan. Blutdruck in der Art. femoralis. Kontraktion der Nickhaut bei Dauerreizung mit Impulsfolgefrequenz von 1/sec. Empfindlichkeit der Registrierung der Nickhautkontraktion 1 : 50. Eichung = 1 mm Nickhautkontraktion bei isotonischer Registrierung. Gesamtkontraktion gegenüber Ruhewert 3 mm. Bei *A* Injektion von 0,2 mg/kg dTC i. v., bei *B* und *C* Injektion von jeweils 0,05 mg/kg Prostigmin i. v. Aufhebung der blutdrucksenkenden und ganglionären Wirkung von dTC durch Prostigmin.

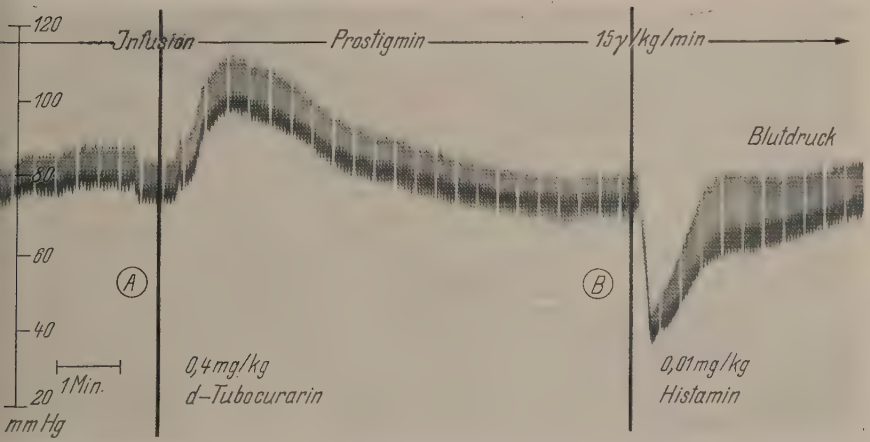


Abb. 4. Versuch vom 2. 8. 1951. Katze. Gewicht 3,0 kg. Narkose: Urethan-Pernocton. Blutdruck in der Art. femoralis. Prostigmindauerinfusion (0,015 mg/kg · min). Bei *A* Injektion von 0,4 mg/kg dTC i. v., bei *B* Injektion von 0,01 mg/kg Histamin i. v. Umkehr der blutdrucksenkenden Wirkung von d-Tubocurarin und Histamin-Blutdrucksenkung während einer Prostigmindauerinfusion. Pulsfrequenz (Auszählung der pulsatorischen Blutdruckschwankungen auf der Originalregistrierung bei Lupenvergrößerung): Vor dTC-Injektion 110/min, während der Blutdrucksteigerung nach dTC 100/min.

Der Antagonismus von dTC und Prostigmin am autonomen Ganglion wurde noch nach folgenden Überlegungen experimentell geprüft: Wenn der dTC-Prostigmin-Antagonismus am Ganglion mit dem an der motorischen Endplatte vergleichbar ist, so erscheint es möglich, durch Prostigmin eine Blockade des Ganglions herbeizuführen, die durch dTC aufhebbar sein muß (vgl. Briscoe[3]). Entsprechende Versuche zeigten, daß dies tatsächlich der Fall war. Während einer durch hoch dosierte (0,015 mg/kg · min) Prostigmindauerinfusion herbeigeführten Blutdrucksenkung und Abnahme der Nickhautkontraktion wurde dTC (0,2 mg/kg) verabreicht (vgl. Abb. 4). Diese Injektion führte augenblicklich zu einer Zunahme des Blutdruckes um 30—40 mm Hg und zu einer schnellen Erholung der Nickhautkontraktion. Beide Reaktionen hielten nur für 1—2 min an, da die Prostigmindauerinfusion weiterlief. Eine solche Umkehr der Blutdruckwirkung des dTC sahen wir in 8 Versuchen (Abb. 4).

5. Die reine Gefäßwirkung des dTC prüften wir weiter am durchströmten Kaninchenohr und sahen bei Perfusion mit dTC-Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-3} keine Wirkung auf die peripheren Gefäße. Die Histamin- und Adrenalinempfindlichkeit des Präparates wurde durch diese Lösungen nicht beeinflußt.

Diskussion.

Es erscheint uns nicht berechtigt, die Histaminfreisetzung durch dTC als alleinige Ursache der Blutdrucksenkung nach dTC anzusehen. Folgende Befunde sprechen für andere Ursachen der Blutdrucksenkung:

dTC führt schon in Dosen, die klinisch zur Muskelerschlaffung benutzt werden, im Tierexperiment zu einer Hemmung der synaptischen Erregungsübertragung im vegetativen System. Nach den Befunden von Guyton und Reeder[12] sind mit 0,2 mg/kg dTC zunächst die parasympathischen Ganglien betroffen, bei einer Dosierung von 0,3 mg/kg dTC auch die sympathischen. Wir konnten bestätigen, daß schon mit Dosen von 0,2 mg/kg dTC eine Hemmung des Ganglion cervicale supremum einsetzt. Leider sind bei Guyton und Reeder die Reizbedingungen (Impulszahl/sec) nicht angegeben. Wir möchten annehmen, daß die optimalen Reizbedingungen für die Auffindung eines Effektes am Ganglion eher bei den niederen Impulsfolgefrequenzen liegen. Die Reizfrequenz-Kontraktionskurve der Nickhaut verläuft im oberen Teil — zu höheren Reizfrequenzen hin — abgeflacht. Wir benutzten daher in unseren Versuchen niedere Impulsfolgefrequenzen (1—2 Reize/sec), mit denen man noch keine maximale Nickhautkontraktion bekommt. Dies erforderte eine entsprechend empfindliche Registrierung.

Gegen die Histaminfreisetzung als Ursache der Blutdrucksenkung nach dTC spricht ferner das Verhalten des Blutdruckes beim Kaninchen, das ebenfalls nach dTC eine Blutdrucksenkung zeigt, auf Histamin aber mit einer Blutdrucksteigerung reagiert.

Auch die Angabe von LANDMESSER[17], daß Antihistaminica (Pyribenzamin und Benadryl) zwar die bronchokonstriktorische, jedoch nicht die blutdrucksenkende Wirkung von dTC aufheben, spricht unseres Erachtens gegen die Bedeutung der Histaminfreisetzung für die Kreislaufwirkungen von dTC.

In unseren Versuchen sahen wir, daß Blutdrucksenkungen nach dTC und nach Histamin durch Prostigmin unterschiedlich beeinflußt werden: die dTC-Blutdrucksenkung wird aufgehoben, die Histamin-Blutdrucksenkung dagegen nicht. Daß dabei Prostigmin eine Histaminfreisetzung durch dTC unterbricht, indem es den Angriff des dTC im Gewebe verhindert bzw. schon haftendes dTC verdrängt und so den Blutdruck zu normalisieren vermag, ist unwahrscheinlich, bedarf allerdings noch experimenteller Überprüfung.

Im Vergleich mit anderen curarisierenden Verbindungen fällt auf, daß ganglienblockende und blutdrucksenkende Wirksamkeit parallel gehen.

So wurde gefunden, daß das Flaxedil praktisch keine ganglionäre Wirkung hat (DEPIERRE[8], VAN DEN OSTENDE[21]) und auch keine Blutdrucksenkung bewirkt. Dagegen hat z. B. das Präparat 3381 R. P. [= Bis-(8-oxychinolin)-α, ω-pentandiäthyljodid] eine blutdrucksenkende *und* ganglionär blockende Wirkung, die mit Aufhebung von Kreislaufreflexen einhergeht. Auch gegenüber dieser Verbindung und seiner ganglionären Wirkung hat das Prostigmin eine antagonistische Wirkung[21].

Für die ganglionäre Wirkung des dTC muß der Einfluß der jeweilig bei den Versuchen benutzten Narkose berücksichtigt werden; denn möglicherweise kann es an den Ganglien zu einer Summation der Wirkungen von Barbitursäure-derivaten (v. BRÜCKE, MACHO, WERNER[5]) und dTC kommen. HEYMANS[14] und VAN DEN OSTENDE[21] fanden in ihren Versuchen, die in Morphin-Chloralosane*-Narkose durchgeführt wurden, keine Blutdrucksenkung und keine Beeinflussung der Kreislaufregulation durch dTC in einer Dosierung, die der bei klinischer Anwendung entspricht (0,15 mg/kg).

Wir hatten bei unseren Versuchen den Eindruck, daß die Blutdrucksenkung unter dTC bei einem hohen Blutdruck (mit offensichtlichem Überwiegen des Sympathicotonus) gering war. Diese Bedingungen liegen im Tierexperiment bei reiner Chloralose-Narkose häufig vor. Es erscheint uns möglich, daß derartige Einflüsse der Narkose für die Unterschiede zwischen den Befunden von HEYMANS und unseren Ergebnissen eine Rolle spielen. Diesen Zusammenhängen kommt eine praktische Bedeutung zu, da bei den klinischen Narkosen oft Barbitursäurederivate mit dTC kombiniert werden.

Gegen die Annahme, daß das Prostigmin gegenüber dem dTC eine antagonistische Wirkung am Ganglion hat, spricht der Befund von CHOU und DE ELÍO[7]. Sie fanden, daß am durchströmten Halsganglion die durch dTC hervorgerufene Blockade durch Eserin, nicht aber durch Prostigmin aufgehoben wird. Möglicherweise

* Chloralosane der Specia-Werke, Paris.

liegen am künstlich durchströmten Ganglion gegenüber den Verhältnissen bei natürlicher Durchblutung veränderte Versuchsbedingungen vor. Über die nähere Natur solcher Unterschiede ist nichts bekannt. van den Ostende[21] fand, daß Prostigmin auch die ganglienblockende Wirkung von 3381 R. P. aufhebt. Es erscheint uns gerechtfertigt, eine antagonistische Wirksamkeit des Prostigmin gegenüber dTC am durchbluteten Ganglion anzunehmen und so unsere Befunde einer Aufhebung der dTC-Blutdrucksenkung durch Prostigmin zu erklären.

Für die Deutung der Umkehr der Blutdruckwirkung von dTC durch vorherige hohe Prostigmindosen kommen u. E. zwei Mechanismen in Frage:

Entweder kommt es durch die Cholinesterasehemmung zu einer Anhäufung von Acetylcholin (A.Ch.) und zum Block durch eine Dauerdepolarisation der an der Erregungsübertragung beteiligten Membranen. Da dTC die Wirkungsschwelle für A.Ch. erhöht, erscheint eine Wiederherstellung geeigneter Verhältnisse zwischen Membranerregbarkeit und A.Ch.-Konzentration durch dTC unter diesen Bedingungen denkbar. Den Parallelfall stellt die Frequenzdurchgängigkeit der motorischen Endplatte des Frosches unter Curarin für höhere Reizfrequenzen dar. Mit der Methode der „Kennlinienschreibung", bei welcher das Aktionspotential des Muskels bei zunehmender Reizfrequenz gemessen wird, wurde von Göpfert und Schaefer[10] eine Aufhebung der Wedensky-Hemmung, die mit A.Ch.-Anhäufung verbunden ist, durch Curare gefunden: das „Frequenzsieb" der motorischen Endplatte wird unter Curare durchgängiger.

Oder man muß annehmen, daß das Prostigmin neben seiner Esterasewirkung auch eine Eigenwirkung auf die synaptischen Membranen hat, diese depolarisiert und dadurch zum Block führt. Da dTC anscheinend eine stabilisierende Wirkung auf die Membranen hat, erscheint auch auf diesem Wege eine Aufhebung des Prostigminblockes am Ganglion durch dTC möglich.

Wir sahen in unseren Versuchen, daß hohe Prostigmindosen zu einer Blutdrucksenkung führen, und beobachteten dabei mehrfach die blutdrucksteigernde Wirkung von dTC.

Die Wirkung des dTC am vegetativen System ist für die klinische Anwendung nicht unbedingt nachteilig, da auch Reflexe unterbrochen werden (z. B. mechanische Reizung des N. vagus bei Operationen), die zum Kreislaufschock führen können. Entsprechende experimentelle Untersuchungen wurden von Burstein, Jackson und Rovenstine[6] durchgeführt.

Zusammenfassung.

d-Tubocurarin bewirkt an narkotisierten Hunden, Katzen und Kaninchen in Dosen, die im Bereich der einfachen bis doppelten Head-drop-Dosis (0,15—0,3 mg/kg) liegen, Senkungen des arteriellen Druckes.

Es wird angenommen, daß diese Blutdrucksenkung auf einer Blockade der sympathischen Ganglien mit Rückwirkung auf die Kreislaufregulation beruht.

Prostigmin (0,05—0,1 mg/kg) hebt bei i. v. Injektion diese Blutdrucksenkung nach dTC auf oder verhindert sie, wenn es als Dauerinfusion gegeben wird (0,01 mg/kg · min).

Durch Prostigmin wird die Blutdrucksenkung nach Histamin nicht beeinflußt.

Prostigmin in höherer Dosierung (Dauerinfusion 0,015 mg/kg · min) führt zu einer Blutdrucksenkung, die durch dTC aufgehoben wird. Erklärungsmöglichkeiten dieses Befundes werden diskutiert.

Die blockierende Wirkung von dTC am Ganglion wurde am Halsganglion der Katze mit präganglionärer Reizung und Registrierung der Nickhautkontraktionen untersucht. dTC hemmt in Dosen, die eine Blutdrucksenkung bewirken, die synaptische Erregungsübertragung im Ganglion. Dieser Block wird ebenfalls durch Prostigmin aufgehoben.

Literatur.

[1] Alam, M., G. V. Anrep, G. S. Barsoum, M. Talaat and E. Wieninger: J. of Physiol. **95**, 148 (1939). — [2] Bean, I. W., and L. H. Elwell: J. of Physiol. **164**, 734 (1951). — [3] Briscoe, G.: J. of Physiol. **86**, 1—3 P (1936). — [4] Brown, G. L., and W. Feldberg: J. of Physiol. **86**, 10 (1936). — [5] v. Brücke, F. T., W. Macho u. G. Werner: Wien. klin. Wschr. **2**, 537 (1947). — [6] Burstein, C. L., A. Jackson and E. A. Rovenstine: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **70**, 718 (1949). — [7] Chou, T. C., and F. I. de Elio: Brit. J. Pharmacol. **3**, 113 (1948). — [8] Depierre, F.: C. r. Acad. Sci. Paris **225**, 956 (1947). — [9] Feldberg, W., and W. D. M. Paton: J. of Physiol. **114**, 490 (1951). — [10] Göpfert, H., u. H. Schaefer: Pflügers Arch. **239**, 597 (1937). — [11] Grob, D., I. L. Lilienthal and A. M. Harvey: Bull. Hopkins Hosp. **80**, 299 (1947). — [12] Guyton, A. C., and R. C. Reeder: J. Pharmacol. a. exper. Therap. **98**, 188 (1950). — [13] Hampel, A.: Pflügers Arch. **244**, 171 (1941). — [14] Heymans, C.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. Dtsch. Pharmakol. Tgg. 1951 (im Druck). — [15] Hoffmann, G., u. E. Witte: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 221 (1950). — [16] Kroebel, W.: Dtsch. med. Rdsch. **3**, Nr. 16 (1949). — [17] Landmesser, C. M.: Anesthesiology **8**, 506 (1947). — [18] Mautner, H., u. E. P. Pick: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **97**, 306 (1923). — [19] Reid, G.: Nature (Lond.) **165**, 320 (1950). — [20] Rein, H.: Erg. Physiol. **45**, 514 (1944). — [21] van den Ostende, A.: Arch. internat. Pharmacodynamie **86**, 439 (1951). — [22] Waser, P.: Helv. Physiol. Acta **8**, 342 (1950).

Dr. W. D. Erdmann, Göttingen, Geiststr. 9, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 464—472 (1952).

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Tübingen.

Versuche zum Nachweis eines spezifischen erythropoetischen Hormons.

II. Mitteilung.

Von

G. Ruhenstroth-Bauer und K. H. Maier.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. August 1950.)

In der ersten Mitteilung[1] wurde der Nachweis geführt, daß die Erythropoese Endglied einer Wirkkette ist, in die ein stoffliches Glied eingeschaltet ist. Der Nachweis der Existenz dieses stofflichen Prinzips wurde auch fast gleichzeitig und unabhängig von Reissmann[2] geführt.

In der ersten Mitteilung[1] wurde zur Frage der Einwirkung der Milz bzw. des reticuloendothelialen Systems auf die Erythropoese eingehend Stellung genommen. Es konnte eine Versuchsanordnung angegeben werden (Injektion von wenigen Tropfen Varicocid in den Milzhilus), die es wahrscheinlich macht, daß die Milz *erythropoesefördernd* wirkt. Weiter konnte gezeigt werden, daß der Bock-Frenzel-sche Versuch[2], der als Stütze der Ansicht herangezogen wird, die normale Milz *hemme* die Erythropoese, zwar reproduzierbar ist, daß jedoch eine Erweiterung der Versuchsanordnung die bisher herangezogene Deutung als nicht zutreffend erwies; die Frage der Förderung oder Hemmung der Erythropoese durch die normale Milz läßt sich mit der Versuchsanordnung von Bock und Frenzel nicht beantworten.

Eine größere Zahl von hämatologischen Arbeiten der Literatur versuchte das Problem der Förderung oder Hemmung der Erythropoese durch die Milz auf folgende Art zu klären: Bei Versuchstieren wurde die Milz operativ entfernt und dann ein mittelschwerer Aderlaß ausgeführt. Je nachdem, ob die dabei beobachtete Reticulocytenreaktion gegenüber den Kontrollen mit einem bloßen Aderlaß als über- oder unternormal befunden wurde, wurde eine Hemmung oder Förderung angenommen[3]. Der Grundgedanke dieses Versuchs ist folgender: Um die Erythropoese zu prüfen, darf man sie nicht in ihrem Normalstand untersuchen, in dem kleine Schwankungen der Reticulocytenwerte und damit der Erythropoese kaum erfaßt werden können, sondern in einem durch einen Aderlaß stark angeregten Zustand. Wird in einem solchen angeregten Zustand die Milz entfernt, so ist zu erwarten, daß sich ihr Einfluß auf die Erythropoese viel klarer erkennen läßt. — Die Arbeiten, die auf diesem Gedanken aufgebaut sind, leiden jedoch alle an einem oder mehreren der folgenden Mängel:

1. An einer zu kleinen Zahl der Versuchstiere; besonders die Zahl der Kontrollen macht eine statistische Sicherung des Unterschieds der beiden Versuchsreihen unmöglich.

2. Der individuelle Einfluß der einzelnen Tiere ist nicht berücksichtigt. Dieser läßt sich nur ausschalten, indem man an den gleichen Tieren Kontroll- und Hauptversuch ausführt und zwischen den beiden Versuchen eine genügend lange Pause einlegt.

3. Der Einwand, die Veränderung der Reticulocytenkurve nach Aderlaß + Milzexstirpation gegenüber der nach bloßem Aderlaß beruhe auf dem unspezifischen Operationsschock, wird nicht widerlegt.

4. Die Erythropoese wird an der Veränderung der Erythrocytenwerte gemessen. Diese sind aber, wie schon vielfach betont wurde (1 u. a.), ein viel zu grobes Maß der Erythropoese und außerdem von einer größeren Zahl weiterer Faktoren, wie z. B. der Blutverdünnung, abhängig.

5. Es werden *chronisch* entmilzte Tiere in den Versuch genommen. Bei solchen hat aber das Restreticuloendothel die Milzfunktion übernommen.

In vorliegender Arbeit wird versucht, das Problem unter Vermeidung dieser Mängel zu klären.

Methodik.

Die Versuche wurden an „reinrassigen" Kaninchen ausgeführt. Diese stammten aus amtlich überprüften privaten Zuchten; es handelte sich jedoch nicht um genetisch reinrassige Tiere, da sie nicht aus Inzuchten hervorgegangen waren. Die Reinrassigkeit bezieht sich also bloß auf den durch mehrere Generationen beobachtbaren Phänotyp. Die drei Rassen — Blaue Wiener, Holländer und Hasenkaninchen — wurden gewählt, da es sich bei ihnen um gut durchgezüchtete Rassen handelt, deren Genformeln wenigstens hinsichtlich einiger charakteristischer Eigenschaften bekannt sind; sie sind aus der Wildform durch Mutationen *verschiedener* Gene entstanden. Außer diesen Unterschieden im Aussehen zeigen sich auch solche des Verhaltens: die Blauen Wiener sind eine trägere Rasse, die Hasenkaninchen sehr lebhaft, die Holländer stehen in der Mitte. Die Versuche wurden von März bis Dezember 1949 ausgeführt. Die Tiere wurden bis Oktober mit Grünfutter, Futterrüben, Hafer und Kleiebrei ad. lib. gefüttert, ab Oktober wurde an Stelle von Grünfutter Heu verabfolgt.

Die Arbeit besteht aus folgenden 3 Abschnitten:

1. Zuerst wurden die Erythrocyten-, Reticulocyten- und Leukocytennormalwerte bei 21 Tieren (7 Blauen Wienern, 5 Holländern und 9 Hasenkaninchen) während 4 Tagen festgestellt (in den Kurven als Tag (— 4) bis (— 1) bezeichnet). Am (— 1.) Tag 8 Uhr wurde bei jedem Tier ein Aderlaß von 12,5 cm^3 Blut/kg Körpergewicht ausgeführt und während der folgenden zwei Wochen in täglichen Zählungen die Änderung der drei Zellarten verfolgt (siehe voll ausgezogene Kurve der Abb. 1 und 2.

2. Nach einer ein- bis zweimonatlichen Pause wurden bei 15 Tieren des Abschnittes 1 (je 5 Blaue Wiener, Holländer und Hasenkaninchen) wieder die Normalwerte während 4 Tagen überprüft (Tag —4 bis —1), am Tag (—1) um 20 Uhr ein Aderlaß wie oben ausgeführt, und am nächsten Tag 0 (Operationstag) 10 Uhr die Milz in i. v. Pernoctonnarkose entfernt. Im Anschluß daran Zählung der drei Zellelemente durch 3 Wochen (siehe gestrichelte Kurve der Abb. 1 und 2).

3. Nach zwei bis drei Monaten wurde bei 14 Tieren des Abschnittes 2 (4 Blaue Wiener, 5 Holländer, 5 Hasenkaninchen) völlig entsprechend dem Abschnitt 2 vorgegangen, nur an Stelle der Milzexstirpation die Entfernung der linken Niere vorgenommen (siehe punkt-gestrichelte Kurven der Abb. 1 und 2). Die Zählung der

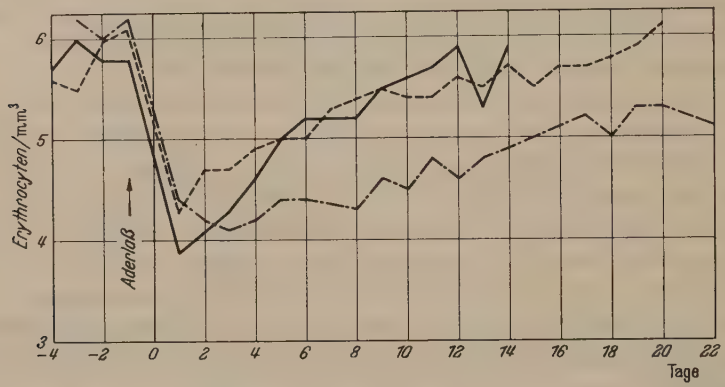


Abb. 1. Durchschnittswerte der Erythrocyten nach Aderlaß am Tage (−1). (———) normale Tiere, (— — —) Tiere nach Milzexstirpation am Tage 0, (— · — · —) Tiere nach Nephrektomie li. am Tage 0.

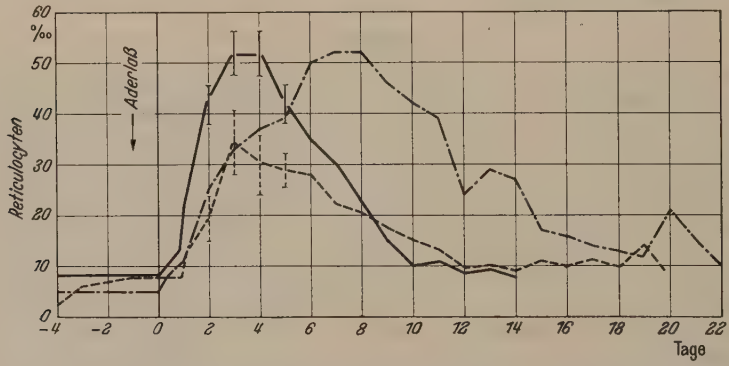


Abb. 2. Durchschnittswerte der Reticulocyten in ‰ nach Aderlaß am Tage (−1). (———) Normale Tiere, (— — —) Tiere nach Milzexstirpation am Tage 0, (— · — · —) Tiere nach Nephrektomie li. am Tage 0.

Erythrocyten erfolgte in einer Zählkammer nach Neubauer[4], die der Reticulocyten nach der Methode von Ruhenstroth-Bauer[1], die der Leukocyten nach Hallmann[5].

Ergebnisse.

Aus den Abb. 1—5 ergibt sich folgendes:

1. Die Durchschnittserythrocytenkurve der normalen Tiere (Abb. 1) nach Aderlaß ist mit der nach Aderlaß + Milzexstirpation praktisch gleich. Nach Nephrektomie fallen die Erythrocytenwerte etwa gleich weit ab wie bei den Normaltieren. Der Anstieg bis zu den Normalwerten ist jedoch verzögert.

2. Die Durchschnittskurve der Reticulocyten (Abb. 2) zeigt bei den Normaltieren und den entmilzten einen deutlichen Unterschied, besonders vom 2.—5. Tag nach der Entblutung: Die Werte liegen bei den entmilzten Tieren um 35—40% niedriger und erreichen die Normalreti-

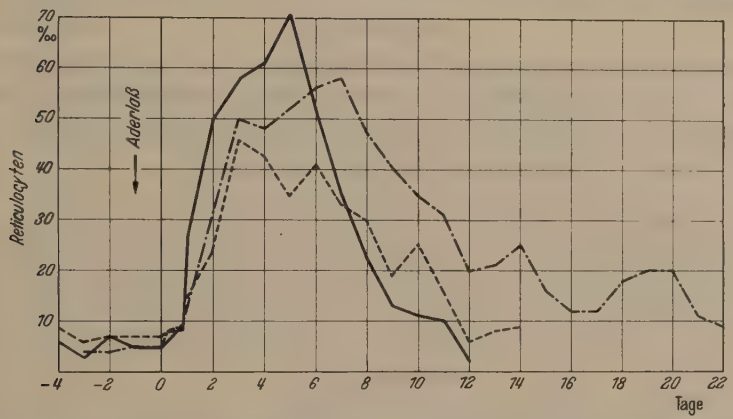


Abb. 3. Durchschnittswerte der Reticulocyten in ‰ der *Blauen Wiener* nach Aderlaß am Tage (−1). (———) Normale Tiere, (— — —) Tiere nach Milzexstirpation am Tage 0, (— · — · —) Tiere nach Nephrektomie li. am Tage 0.

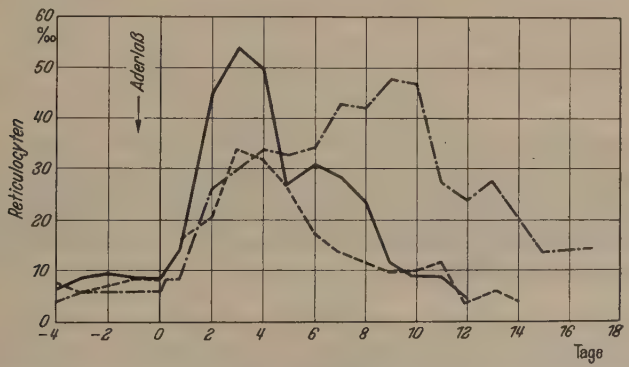


Abb. 4. Durchschnittswerte der Reticulocyten in ‰ der *Hasenkaninchen* nach Aderlaß am Tage (−1). (———) Normale Tiere, (— — —) Tiere nach Milzexstirpation am Tage 0, (— · — · —) Tiere nach Nephrektomie li. am Tage 0.

culocytenwerte um 2 Tage später als die Kontrollen. Bei den entnierten Tieren liegt der Höchstwert der Reticulocyten 3 Tage später als bei den normalen Tieren, die Höhe des Gipfels ist aber die gleiche. Die Normalwerte werden erst nach einer starken Verzögerung erreicht.

3. Die Abb. 3—5 zeigen die Reticulocytendurchschnittskurven getrennt nach den drei verschiedenen Rassen. Bei allen drei Rassen ist die niedrigste und die Nierentierkurve verzögert. Bei den Blauen Wienern (Abb. 3) ist die Nierentierkurve auch niedriger als die Normaltierkurve,

bei den Hasenkaninchen (Abb. 4) sind beide ungefähr gleich hoch, während bei den Holländern die Reticulocytenwerte der entmilzten Tiere fast um die Hälfte höher steigen als bei den Kontrollen (Abb. 5).

Bei den Leukocyten konnte kein verwertbarer Unterschied festgestellt werden.

Besprechung.

Entgegen dem meist in der Literatur vertretenen Standpunkt[6, 7] beweisen unsere an genügend großem Tiermaterial vorgenommenen Untersuchungen, daß die Erythrocytenzahlen nach einem Aderlaß durch eine

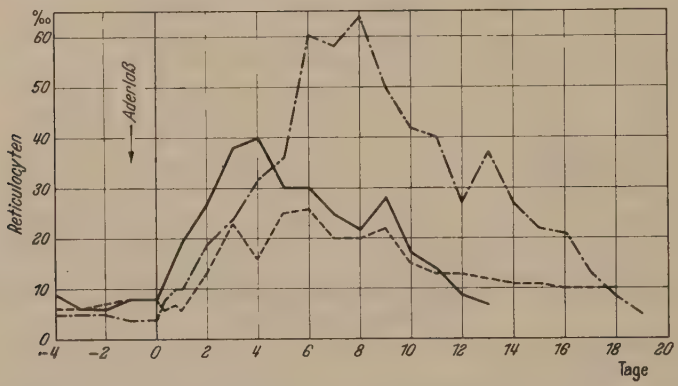


Abb. 5. Durchschnittswerte der Reticulocyten in ‰ der *Holländer* nach Aderlaß am Tage (−1). (———) Normale Tiere, (− − −) Tiere nach Milzexstirpation am Tage 0, (− · − · −) Tiere nach Nephrektomie li. am Tage 0.

kurz darauf folgende Milzexstirpation kaum beeinflußt werden. Daß die Entfernung der linken Niere eine Verzögerung der Erholung der Erythrocytenwerte verursacht, kann möglicherweise mit Änderungen im Wasserhaushalt der Tiere zusammenhängen, die zu einer Verlängerung der Blutverdünnung führen.

Tabelle 1.

Tage	1	2	3	4	5	6
Durchschnittswerte der Normaltiere (21 Versuche)	22,0	41,5	51,7	51,5	42,4	35,2
mit dem dazu gehörigen σ_m	± 2,6	± 3,9	± 4,2	± 4,2	± 3,7	± 3,3
Durchschnittswerte der entmilzten Tiere (15 Versuche)	12,1	18,5	34,2	30,2	29,0	28,2
mit dem dazu gehörigen σ_m	± 2,2	± 4,1	± 5,7	± 6,0	± 3,5	± 3,8
Mittlere Streuung der Einzelwerte bei den Normaltieren	11,9	17,9	19,2	19,2	17,0	15,1
Mittlere Streuung der Einzelwerte bei den entmilzten Tieren	8,5	15,9	22,1	23,2	13,6	14,7
Mittelwertsdifferenz	9,9	23,0	17,5	21,3	13,4	7,0

Die Erniedrigung der Durchschnittsreticulocytenkurve der Milztiere gegenüber der bei normalen Tieren ist dagegen eine deutliche. In Tab. 1 sind die Zahlenwerte und deren Streuungen in den Tagen 1—6 verzeichnet. Im Mittel beträgt die Streuung der Einzelwerte der 1. Reihe 16,7, der 2. Reihe 16,3, im Durchschnitt 16,5. Die Streuung der Differenzen beträgt dann

$$\mathrm{Str}\,(\Delta y) = s\sqrt{\frac{n_1+n_2}{n_1\cdot n_2}} = 16{,}5\ \sqrt{\frac{36}{21\cdot 15}} = 5{,}57.$$

Wird die 3σ-Grenze als Zufallsgrenze angenommen, so wären demnach bei den Kurven nur Unterschiede über 16,7 beweisend.

In Wirklichkeit ist aber der Unterschied der Kurven in viel höherem Maße gesichert. Dies ergibt sich aus der Überlegung, daß sich die einzelnen Punkte jeder Kurve gegenseitig stützen. Dies läßt sich mittels einer Fourier-Entwicklung nach den Lorenzschen Polynomen der Unterschiede Δy zeigen. Dieses Vorgehen soll demnächst in einer eigenen Arbeit[8] eingehend unter Zugrundelegung des vorliegenden Beispiels erläutert und hier nur kurz skizziert werden.

Die in Rede stehende Entwicklung lautet:

$$\Delta y = A_0 + A_1X_1(x) + A_2X_2(x) + \ldots \text{ mit } A_n = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} \Delta y_i X_n(x_i).$$

Wegen der Normierung der Polynome X_n folgt für die Streuung der Koeffizienten A_n die einfache Formel

$$\mathrm{Str}\,(A_n) = \frac{\mathrm{Str}\,(\Delta y)}{N}\sqrt{\sum_{i=1}^{N} X_n^2(x_i)} = \frac{\mathrm{Str}\,(\Delta y)}{N}\sqrt{N} = \frac{\mathrm{Str}\,(\Delta y)}{\sqrt{N}},$$

in unserem Beispiel mit $N = 6$

$$\mathrm{Str}\,(A_n) = s\sqrt{\frac{n_1+n_2}{n_1n_2N}} = 16{,}5\sqrt{\frac{36}{21\cdot 15\cdot 6}} = 2{,}28;\ 3\sigma = \underline{6{,}84}.$$

In unserem Fall lautet also das Kriterium für den gesicherten Unterschied zwischen den Beobachtungsreihen, daß die Koeffizienten A_n des Lorenzschen Polynoms größer als 6,84 sind.

Die Rechnung für die Koeffizienten A_n ist in folgender Tabelle ausgeführt:

Tabelle 2.

X_1	X_2	Δy	$\Delta y \cdot X_1$	$\Delta y \cdot X_2$	Δy^2
— 1,4639	+ 1,3363	9,9	— 14,493	+ 13,229	98,01
— 0,8783	— 0,2673	23,0	— 20,201	— 6,148	529,00
— 0,2928	— 1,0690	17,5	— 5,124	— 18,708	306,25
+ 0,2928	— 1,0690	21,3	+ 6,237	— 22,770	453,69
+ 0,8783	— 0,2673	13,4	+ 11,769	— 3,582	179,56
+ 1,4639	+ 1,3363	7,0	+ 10,247	+ 9,354	49,00
	Summe Σ	= 92,1	— 11,565	— 28,625	1615,51
	$\frac{1}{6}\sum$	= 15,35	— 1,93	— 4,77	269,3
		$= A_0$	$= A_1$	$= A_2$	$= A_0^2 + A_1^2 + \ldots A_6^2$

Das Ergebnis lautet, daß nur A_0 größer ist als der 3-σ-Wert 6,84. Da sich dieser Koeffizient A_0 auf die Höhenunterschiede der zu vergleichenden Kurven bezieht, ist damit statistisch gesichert, daß der Höhenunterschied nicht zufällig sein kann; dagegen sind die verschiedenen Formunterschiede der Kurven, die sich in den Koeffizienten A_1, A_2 usw. ausdrücken, nicht groß genug, um als statistisch gesichert angesehen werden zu können.

Mit diesem Befund ist ein weiterer Beweis dafür erbracht, daß mit der Entfernung der normalen Milz keine Hemmung der Erythropoese wegfällt, denn dann müßte die Erythropoese *akut milzloser* Tiere schneller einsetzen als bei den normalen Kontrollen und steiler ansteigen. Der Befund macht es im Gegenteil wahrscheinlich, daß durch die Entfernung der normalen Milz ein fördernder Faktor der Erythropoese beseitigt worden ist. — Daß die Erythropoeseverminderung der milzlosen Tiere nicht durch den unspezifischen Operationsschock erklärt werden kann, geht daraus hervor, daß der mindest gleichgroße Eingriff einer linksseitigen Entnierung keine solche Minderung mit sich bringt.

Folgende Voraussetzungen vorliegender Arbeit müssen noch besprochen werden: der Gedankengang ist nur dann richtig, wenn die Reticulocyten bei entmilzten Tieren wenigstens gleich lange leben wie bei normalen. Nach den Untersuchungen von Jakobsen und Plum[9] über den Reticulocytenreifungsstoff bei akut entmilzten Tieren in den ersten Tagen nach der Operation ist dieser im Plasma solcher Tiere in geringerer Konzentration enthalten als bei Normaltieren. Es ist demnach zu erwarten, daß bei akut entmilzten Tieren die Reticulocyten eher länger leben, als bei normalen. Demnach gewinnt unsere Schlußfolgerung noch mehr an Gewicht. — Es bestände noch die Möglichkeit, daß ein Teil der Erythrocyten im Knochenmark stärker ausreifen und ihr Reticulum schon im Knochenmark verlieren, da nach Milzentfernung eine Störung der Entkernung im Knochenmark vorliegen soll. Da aber Plum[10, 11] gezeigt hat, daß die Entkernung mit der Bildung von Erythrocyten selbst nichts zu tun hat und eine Knochenmarkskultur, deren Zellen sich infolge von Vergiftung mit Colchicin alle im Stadium der Mitose befinden, noch weiter Erythrocyten erzeugen können, dürfte diese Möglichkeit wenig Wahrscheinlichkeit haben.

Es ist offensichtlich, daß bei chronisch entmilzten Tieren andere Verhältnisse herrschen, da dort das Restreticuloendothel Zeit hatte, die Milzfunktion zu übernehmen. Unsere Befunde lassen sich daher auf solche Tiere nicht übertragen. — Desgleichen scheint uns der Einwand nicht stichhaltig, durch die Operation seien die Eisenvorräte des Körpers vermindert, so daß die Erythropoese sich verzögert, denn

1. ist die Milz bei Kaninchen relativ klein,

2. läßt sich aus den Arbeiten von Whipple c. s.[12] schließen, daß die Körpereisenvorräte erst bei Erschöpfung begrenzend auf die Erythropoese wirken; und wäre

3. eine beträchtliche Verminderung der Eisenvorräte durch die Operation der Grund der verminderten Erythropoese, so müßten diese erst durch die Nahrung wieder aufgefüllt werden; das würde länger dauern als es in unseren Versuchen der Fall war.

Im Verein mit dem in der Einleitung erwähnten Varicocidversuch kann man daher aus obigem Ergebnis die fördernde Funktion der Milz und damit des reticuloendothelialen Systems auf die Erythropoese als wahrscheinlich annehmen. Mit dem Ausfall unseres Versuches ist allerdings noch nicht bewiesen, daß Milz und Reticuloendothel in den Steuerungsmechanismus selbst eingeschaltet sind. Es wäre auch möglich, daß eine normal funktionierende Milz, bzw. das Reticuloendothel nur eine Voraussetzung einer normalen Erythropoese sind, ohne aber Steuerungsfunktionen auszuüben, so wie das kürzlich[13] von der Nebennierenrinde in ihrer Wirkung auf die Blutverdünnung bei Aderlaß nachgewiesen wurde.

In diesem Zusammenhang sei noch auf 2 kürzlich erschienene Arbeiten von Jacobsen c. s. 14,15 hingewiesen. Die Verfasser bestrahlten Mäuse mit Röntgenstrahlen in einer Dosis von 1025 r. Die Tiere starben nach längstens 14 Tagen. Die hämatopoetische Funktion des Knochenmarks war schon nach wenigen Tagen hochgradig gestört und erholte sich im Laufe der nächsten Tage kaum mehr. Wurde aber bei der Bestrahlung der Tiere die Milz durch Blei geschützt, so kam es zwar nach 2—4 Tagen ebenfalls zu einer schweren Knochenmarkschädigung, die jedoch im Laufe der nächsten Tage repariert wurde. Bei Kaninchen wurden ähnlich angelegte Versuche mit gleichem Erfolg durchgeführt. Bei diesen Tieren war auch der Bleischutz des Blinddarms mit seinem umfangreichen RES für die Wiederherstellung der Knochenmarksfunktion ausreichend. Von dem Verfasser wird auf Grund dieser Versuche die Möglichkeit diskutiert, daß die normale Milz bzw. ein normal funktionierendes reticuloendotheliales System eine positive Wirkung auf die Hämatopoese ausüben könnte.

Aus den Abb. 3—5 ist klar ersichtlich, daß auch bei Versuchen mit Kaninchen rassische Faktoren eine große Rolle spielen, und daß demnach die bei Ratten- und Mäuseexperimenten fast schon selbstverständliche Forderung nach einheitlichem Tiermaterial auch bei diesen Tieren unbedingt beachtet werden muß, wenn man verschiedene Versuchsserien vergleichen will. — Ob auch jahreszeitliche Schwankungen eine Rolle spielen, müßte in besonderen Versuchsreihen geklärt werden.

Zusammenfassung.

1. Eine Entmilzung unmittelbar nach einem Aderlaß hat praktisch kaum einen Einfluß auf die Erythrocyten- und Leukocytenwerte während der darauf folgenden zwei Wochen.

2. Die Reticulocytenwerte nach Aderlaß werden dagegen durch eine unmittelbar nachfolgende Entmilzung für die nächsten 6 Tage deutlich vermindert. Der Unterschied ist signifikant. Daraus läßt sich folgern, daß die normale Milz mit Sicherheit keine hemmende Funktion auf die Erythropoese, sondern vielleicht eine fördernde ausübt.

3. Entnierung nach Aderlaß verzögert die Normalisierung der Erythrocytenzahl. Die Reticulocytenkurve ist ebenfalls verzögert, der Gipfel ist aber gleich hoch wie bei den Normaltieren.

4. Die drei in Versuch genommenen Rassen: Blaue Wiener, Holländer und Hasenkaninchen zeigen deutliche Unterschiede in der Stärke der Erythropoese nach Aderlaß, nach Aderlaß und Entmilzung und nach Aderlaß und Entnierung. Beim Vergleich von Versuchsserien muß daher auch beim Kaninchen einheitliches Tiermaterial verwendet werden.

Literatur.

[1] Ruhenstroth-Bauer, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 32 (1950). — [2] Bock, H., u. B. Frenzel: Klin. Wschr. **17**, 1315 (1938). — [3] Hirschfeld, H., u. W. Fabisch: Fol. haemat. (Lpz.) **37**, 262 (1928). — [4] Praktikum der klinischen ... Untersuchungsmethoden. Berlin-München: Urban und Schwarzenberg 1948. — [5] Hallmann, L.: Klinische Chemie und Mikroskopie. Leipzig: Thieme 1939. — [6] Gabathuler, A.: Z. exper. Med. **65**, 498 (1929). — [7] Istomanowa, F., Mjassnikow u. Swatskaja: Z. exper. Med. **52**, 160 (1926). — [8] In Vorbereitung. — [9] Jakobsen, E., u. Cl. Plum: Acta Physiol. Scand. **5**, 1 (1943). — [10] Plum, M. C.: Sang **19**, 659 (1949). — [11] Plum, M. C.: Blood **2** (Sonderheft Nr. 1), 1947. — [12] Hahn, P., W. Bale, E. Lawrence and G. Whipple: J. Amer. Med. Assoc. **111**, 2285 (1938). — [13] Ruhenstroth-Bauer, G.: Pflügers Arch. (im Druck). — [14] Jacobsen, C. O., E. L. Simmons, W. E. Bethard, E. K. Marks and M. J. Robson: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **73**, 455 (1950). — [15] Quart. Rep. Inst. of Radiobiol. Chicago: Spring 1950.

Dozent Dr. G. Ruhenstroth, Tübingen, Max-Planck-Institut für Biochemie.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 473—480 (1952).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Göttingen
(Direktor: Professor Dr. R. Schoen).

Quantitative Untersuchungen an den Lipoiden des menschlichen Blutserums.

Von
Günter Schulze.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Dezember 1951.)

Die Literatur über den Gehalt des menschlichen Blutserums an Fettstoffen ist noch voll von widersprechenden Angaben. Diese sind im wesentlichen auf die Ergebnisse unterschiedlicher Methoden, welche zur Bestimmung der Einzelfraktionen zur Anwendung kamen, zurückzuführen.

Die quantitative Bestimmung der phosphorhaltigen Lipoidbestandteile erfolgte im allgemeinen über eine Analyse des sogenannten „Lipoid-P". Dabei lieferte die Bestimmung des sogenannten „Rest-P" — man versteht darunter die Differenz aus Gesamt-P und säurelöslichem P — befriedigend übereinstimmende Werte mit den Ergebnissen, die nach Veraschen der Stoffe gewonnen wurden, die mit Alkohol/Äther aus dem Serum zu extrahieren sind. Bei den quantitativen Angaben findet man deswegen meistens die Angabe des sogenannten „Lipoid-P" oder aber einen durch Umrechnung mit einem fixen Faktor gewonnenen Wert für „Lecithin".

Cholesterin wird im allgemeinen getrennt als freies und als Ester-Cholesterin angegeben. Die Werte sind nach der Methode von Schoenheimer-Sperry[1] und deren Abwandlungen oder nach Schmidt-Thomée[2] bestimmt.

Das Fett wird meistens als „Gesamt-Fettsäuren" entweder gravimetrisch oder oxydometrisch bestimmt, nachdem der Gesamtextrakt aus dem Serum vorher verseift wurde. Die Brauchbarkeit und experimentelle Genauigkeit ist bei allen genannten Methoden nicht in Zweifel zu ziehen, jedoch bestehen Mängel insofern, als bei den beiden erstgenannten Methoden die gewichtsmäßig größten Anteile des Moleküls in die Analyse überhaupt nicht eingehen und die Bestimmung der „Gesamt-Fettsäuren" sowohl die Fettsäuren aus Phosphatiden, Cholesterinverbindungen, Triglyceriden und eventuell im Serum frei vorkommende Fettsäuren umfaßt. Eine Aufschlüsselung des gewonnenen Ergebnisses für „Gesamt-Fettsäuren" auf die einzelnen Molekülverbindungen läßt sich nachträglich entweder überhaupt nicht oder nur sehr ungenau durchführen. Siehe hierüber auch die Kritik von I. P. Peters und D. D. van Slyke[3].

Aus den aufgeführten Gründen wurden Beziehungen zwischen den relativ genau bestimmbaren Anteilen der Serumlipoide leicht gefunden und aufgestellt, während Beziehungen zu den nur ungenau bestimmbaren Anteilen höchstens vermutet werden können[4].

Nach Voruntersuchungen haben wir eine Methode entwickelt, die es gestattet die einzelnen Molekülverbände der Serumlipoide unzerstört

voneinander zu trennen und quantitativ zu bestimmen. So wurden Angaben über die einzelnen Stoffe der Serumlipoide gewonnen, die bisher nicht beschrieben sind und es gestatten, Beziehungen zwischen den einzelnen Stoffen der Serumlipoide aufzustellen, die teils neu sind, teils Bekanntes bestätigen, vereinfachen und unter weiterem Gesichtswinkel zu sehen.

Methodik.

Zur Untersuchung kamen in den einzelnen Versuchen jeweils 10 cm^3 Serum von Blut, welches den Versuchspersonen morgens nüchtern entnommen wurde. Genau 10 cm^3 Serum wurden in Anlehnung an die von Bloor[5] angegebene Methode mit 150 cm^3 einer Mischung von Methanol/Äther 3 : 1 erschöpfend extrahiert. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck und unter erhöhter Temperatur entfernt. Der Rückstand wurde in Petroläther/Benzol 14 : 1 aufgenommen und in vorgewogene 50-cm^3-Erlenmeyer-Kolben filtriert. Nach erneutem Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand gewogen. Dieser Rückstand, der die mit Methanol/Äther 3 : 1 extrahierbaren und in Petroläther/Benzol 14 : 1 löslichen Lipoide des Serums umfaßt, wird im Folgenden sowie in den Tabellen und Abbildungen als „Gesamt-Lipoide" bezeichnet. Die Gesamt-Lipoide wurden dann an Zucker und Aluminiumoxyd adsorptiv quantitativ getrennt[6, 7].

Ergebnisse.

Bei der Trennung des gewonnenen Lipoidgemisches werden folgende Fraktionen erhalten: Phosphatide, Cholesterin-Ester, Neutralfette, freie Fettsäuren, freie Sterine, eine Fraktion, welche Kohlenwasserstoffe und Wachse enthält, und eine Fraktion unbekannter Zusammensetzung. In Tab. 1 sind die gefundenen Werte für die Einzelfraktionen aus den Seren von 10 gesunden Versuchspersonen aufgeführt. Für „Gesamtlipoide" (siehe Spalte 1) fand sich im Mittel der 10 Versuche der Wert von 656,7 mg% des Serums. Die einzelnen Werte sind erheblichen Streuungen unterworfen (400—900 mg%), liegen jedoch innerhalb der Grenzen, die auch von anderen Untersuchern angegeben sind[8, 9, 10, 11]. Der gefundene Wert für Phosphatide des Serums stimmt mit einem Mittelwert von 157,4 mg% ebenfalls mit den von anderen Untersuchern mit anderen Methoden gefundenen Werten überein[4, 12, 13, 14, 15]. Dabei ist jedoch bemerkenswert, daß auch in der Phosphatidfraktion die einzelnen Werte erheblichen Schwankungen unterworfen sind. Der von mir gefundene Wert für Cholesterin-Ester (siehe Spalte 3) liegt mit einem Mittelwert in 10 Versuchen von 193,8 mg% des Serums höher, als er aus vielen Untersuchungen bekannt ist. Man muß bei diesem Wert jedoch berücksichtigen, daß er im Gegensatz zu den üblichen Angaben von Cholesterin-Ester-Werten den Gewichtswert der veresterten Fettsäure mit enthält. Wenn man auf den Gehalt an Cholesterin umrechnet, was man natürlich ohne genaue Kenntnisse der veresterten Fettsäuren nur nährungsweise kann, kommt man auf eine gute Übereinstimmung mit sonst bekannten Zahlen, die mit anderen Methoden gewonnen wurden. Der Mittelwert für

Tabelle 1. *Untersuchungen von Serumlipoiden bei gesunden Versuchspersonen.*

	1.	2	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Vers. Nr. Protokoll Nr.	Gesamtlipoide	Phosphatide	Cholesterinester	Neutralfette	freie Fettsäuren	freie Sterine	Kohlenwasserstoffe und Wachse	Unbekannt
	in mg% des Serums							
1	746,8	103,7	178,6	237,5	138,4	12,5	25,0	51,1
2	554,2	227,6	95,4	129,8	32,3	16,0	20,5	22,6
3	469,4	150,6	—	138,5	—	25,6	28,7	58,0
4	699,1	79,7	373,3	167,1	0	29,8	17,7	43,1
5	400,1	63,4	116,0	71,0	59,5	30,5	24,1	35,6
6	521,0	46,0	141,5	173,7	90,9	12,1	19,0	38,7
7	881,2	150,8	476,8	105,8	15,6	28,6	24,3	79,1
8	598,3	200,2	125,2	162,9	20,5	12,7	22,1	43,7
9	772,2	325,7	84,7	179,5	83,0	41,8	17,3	55,2
10	925,0	216,4	152,3	382,2	75,1	40,8	25,8	71,2
Mittel	656,7	157,4	193,8	174,8	57,3	25,0	22,5	49,8
	in % der „Gesamt-Lipoide"							
Mittel	100,0	24,0	29,6	26,6	8,7	3,8	3,4	7,6

das freie Cholesterin (siehe Spalte 6) liegt mit 25 mg% des Serums im Bereich der von anderen Untersuchern gefundenen Werte. Die Werte für Neutralfett, die hier erstmalig selektiv bestimmt wurden, liegen im Mittel von 10 Versuchen bei 174,8 mg% des Serums (siehe Spalte 4). Direkte Vergleichswerte liegen nicht vor. Der gefundene Wert liegt jedoch in den von PETERS und MAN[4] angegebenen Grenzen, die mit anderen Methoden nährungsweise bestimmt wurden. Der von mir gefundene Wert liegt höher als der von diesen Autoren vermutete Mittelwert. Die Bestimmung der freien Fettsäuren erfolgt als Differenzberechnung. Der angegebene Wert schließt deswegen den Fehler der Methode mit ein und ist nur mit Vorbehalt zu bewerten (siehe hierüber auch[6, 7]). Wir fanden einen Mittelwert aus ebenfalls 10 Versuchen von 57,3 mg% des Serums. Vergleichswerte sind mir nicht bekannt. Über die in den Spalten 7 und 8 aufgeführten Fraktionen liegen ebenfalls noch keine vergleichbaren Angaben vor. Die in Spalte 7 aufgeführten Fraktionen werden mit Petroläther von Aluminiumoxyd gewonnen. In Modellversuchen[6] werden dabei Kohlenwasserstoffe und Wachse eluiert, ohne scharfe Trennung beider Stoffgruppen. Bei der Mehrzahl der Seren kann man in dieser Fraktion eine positive LIEBERMANN-BURGHARDTsche Probe anstellen[16, 17]. Eine nähere Identifizierung dieser Stoffgruppe wurde nicht vorgenommen. Die angenommene Bezeichnung dieser Stoffe beruht auf einem Analogieschluß und ist nicht das Ergebnis näherer Untersuchungen. Die in

Spalte 8 aufgeführten Stoffe werden mit Äther von Saccharose eluiert[7]. Über ihre Zusammensetzung habe ich keine Untersuchungen angestellt.

Wenn wir also unsere an Seren gesunder Menschen gewonnenen Werte für die einzelnen Fraktionen zusammenfassen, ergeben sich folgende Befunde:

Im Serum gesunder Versuchspersonen finden sich im Mittel 656,7 mg% Gesamtlipoide. Davon entfallen auf Phosphatide im Mittel 157,4 mg% entsprechend 24% der Gesamtlipoide. Auf Cholesterin-Ester entfallen 193,8 mg% entsprechend 29,6% der Gesamtlipoide. Die Neutralfette sind mit 26,6% an den Gesamtlipoiden beteiligt und finden sich im Mittel zu 174,8 mg% im Serum. Die freien Sterine, die Kohlenwasserstoffe und Wachse und eine unbekannte Stoffgruppe sind zu 25,0 mg%, zu 22,5 mg% und zu 49,8 mg% im Serum vorhanden. Ihr Anteil an den Gesamtlipoiden beträgt 3,8, 3,4 und 7,6%. Die Differenz kann auf freie Fettsäuren entfallen und wird als solche mit 57,3 mg% des Serums entsprechend 8,7% der Gesamtlipoide errechnet angegeben.

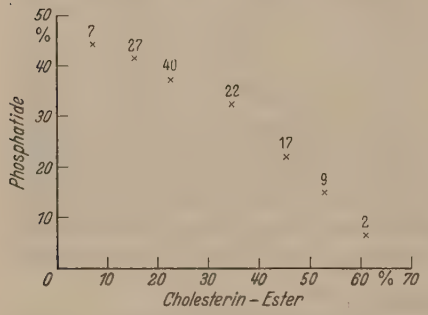


Abb. 1. Verhalten der Cholesterinester und der Phosphatide im menschlichen Blutserum. Ordinate, Abszisse: Prozent der „Gesamtlipoide".

Wenn man die gefundenen Werte für Phosphatide und Cholesterin-Ester in Tab. 1 genauer ansieht und sie zur Menge der Gesamtlipoide in Beziehung setzt, hat es den Anschein, als ob Cholesterin-Ester und Phosphatide zueinander in bestimmten Beziehungen stehen, derart, daß einem hohen Gehalt des Serums an Phosphatiden ein relativ niedrigerer an Cholesterin-Estern verbunden ist, und umgekehrt. Wir haben versucht, diese Vermutung zu prüfen und zu diesem Zweck eine große Anzahl von Seren auf ihren Lipoidgehalt und dessen Zusammensetzung hin untersucht. Außer Seren gesunder Versuchspersonen haben wir auch solche Seren untersucht, bei denen Abweichungen vom Normalen möglich und wahrscheinlich waren.

In Abb. 1 sind auf der Ordinate die gefundenen Phosphatidwerte und auf der Abszisse die gefundenen Werte für Cholesterin-Ester — beide angegeben in % der Gesamtlipoide — anfgeführt. Der Abb. 1 liegen insgesamt 124 Serum-Lipoid-Analysen zugrunde. Aus den Analysen mit einem Cholesterin-Esterwert zwischen 0 und 10, 11 und 20 usw. bis 60% der Gesamtlipoide wurde sowohl der Mittelwert der angegebenen Stufen für Cholesterin-Ester, als auch der korrespondierende Wert für Phosphatide errechnet und die beiden Werte gegeneinander aufgetragen. Die jeweils bei den Kurvenpunkten angegebene Zahl ist die Anzahl der

Analysen, die der Bestimmung des Punktes jeweils zugrunde lag. Aus dem Diagramm ist klar ersichtlich, daß zu einem niedrigen Cholesterin-Ester-Gehalt des Serums ein hoher Phosphatidgehalt gehört, und daß einem niedrigen Phosphatidgehalt ein hoher Cholesterin-Ester-Gehalt im Serum vergesellschaftet ist. Bei 50% der Untersuchungen fanden sich Cholesterin-Ester-Werte zwischen 22 und 35% der Gesamtlipoide mit entsprechendem Phosphatidgehalt zwischen 33 und 37% der Gesamtlipoide. Die restlichen 50% der Werte streuen etwa gleichmäßig häufig in beiden Richtungen. Diese beiden Stoffgruppen stehen jedoch nicht in linearem Abhängigkeitsverhältnis. Die Summe beider Substanzen ist nicht konstant.

Trägt man die Summe von Cholesterin-Ester- und Phosphatidgehalt gegen den Cholesteringehalt auf, steigt die Summe von Phosphatid- und Cholesterin-Ester-Gehalt mit steigendem Cholesterin-Ester-Gehalt an. Daraus läßt sich schließen, daß die Summe der beiden Substanzen durch eine dritte über die Cholesterin-Ester veränderlich sein muß. Die von mir an Phosphatiden und Cholesterin-Estern dargestellten Beziehungen stehen in guter Übereinstimmung mit den von Peters und Man[4] erhobenen Befunden und ergänzen diese insofern, als für die genannten Beziehungen nur das Estercholesterin verantwortlich ist, während, wie meine Versuche zeigen, das freie Cholesterin relativ konstant ist.

In weiteren Versuchen haben wir bei 7 Versuchspersonen den Serumlipoidgehalt und dessen Zusammensetzung auf der Höhe der Dünndarmverdauung bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tab. 2 zusammengestellt. Während im Nüchternserum ein mittlerer Gesamt-

Tabelle 2. *Verhalten der Serumlipoide auf der Höhe der Dünndarmverdauung.*

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Versuch Nr. Protokoll Nr.	Gesamtlipoide	Phosphatide	Cholesterinester	Neutralfette	freie Fettsäuren	freie Sterine	Kohlenwasserstoffe und Wachse	Unbekannt
	in mg% des Serums							
11	860,4	290,7	337,3	177,4	0	55,6	12,6	72,0
12	632,7	94,0	315,7	131,0	0	30,0	54,3	65,7
13	674,1	165,6	278,0	122,5	0	36,7	18,1	61,0
14	948,4	363,9	266,9	194,6	0	31,4	25,5	63,0
15	829,7	305,5	249,1	216,5	0	23,1	14,0	56,9
16	940,0	411,4	257,8	148,9	0	17,4	28,9	71,3
17	981,4	368,9	446,8	143,2	0	—	—	87,2
Mittel	838,1	285,7	307,4	176,3	0	32,4	25,6	78,2
	in % der „Gesamt-Lipoide"							
Mittel	100,0	34,2	36,6	21,5	0	3,8	2,7	9,3

lipoidgehalt von 656,7 mg% vorhanden war, fand ich in diesen Versuchen einen mittleren Gehalt der gleichen Substanzen von 838,1 mg% im Serum. Die Zunahme beruht im wesentlichen auf einer Zunahme an Phosphatiden und Cholesterin-Estern, deren Anteil an den Gesamt-Lipoiden jetzt 34,2% bzw. 36,6% betragen, gegenüber 24,0% und 29,6% im Nüchternserum. Trotz des Neutralfett-Angebotes vom Darm her haben die Neutralfette im Serum eher ab- als zugenommen. Sie sind im

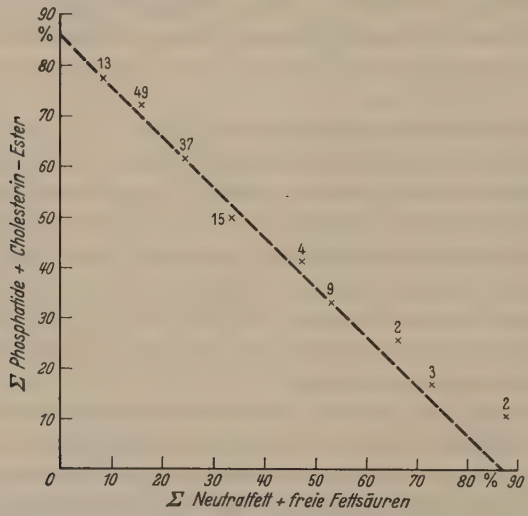


Abb. 2. Abhängigkeit der Summe von Phosphatiden und Cholesterinestern einerseits und der Summe von Neutralfett und freien Fettsäuren andererseits. Ordinate, Abszisse: Prozent der „Gesamtlipoide".

wesentlichen in ihrer Menge unverändert geblieben. Ebenso verhalten sich die freien Sterine, die Fraktion der Kohlenwasserstoffe und Wachse und die Fraktion unbekannter Zusammensetzung. Lediglich die freien Fettsäuren sind in allen Versuchen auf der Höhe der Dünndarmverdauung erheblich abgesunken, in diesen Versuchen in allen Fällen auf den Wert 0. Trotz der vorher diskutierten Ungenauigkeit gerade des Wertes für freie Fettsäuren dürfte dieser konstante Befund den wahren Verhältnissen entsprechen. Diese Befunde stehen in gewissem Widerspruch zu den Untersuchungen von Man und Gildea[18], die nach Probemahlzeiten zwar einen Anstieg der Gesamt-Fettsäuren im Serum fanden, diesen aber auf einen Anstieg an Neutralfett zurückführten, zumal nach ihren Untersuchungen die in Phosphatiden gebundenen Fettsäuren nicht mit angestiegen waren.

Wenn wir diese Befunde mit den bereits vorher diskutierten in Zusammenhang bringen, kommen wir zwingend zu der Annahme, daß der Gehalt des Serums an Phosphatiden und Cholesterin-Estern und speziell

die Summe beider in innigem Verhältnis zum Neutralfettgehalt des Serums steht.

Für unsere weiteren Untersuchungen habe ich Neutralfette und freie Fettsäuren mengenmäßig durch Addition zusammengenommen, weil bei der Trennung beider Substanzen an Aluminiumoxyd ein Teil des Neutralfettes in Diglycerid und Fettsäuren gespalten wird[6]. Deswegen glaube ich, beim Arbeiten mit der Summe beider Substanzen genauer zu sein, zumal beide Stoffe auch stoffwechselphysiologisch in engstem Kontakt stehen. In Abb. 2 ist auf der Ordinate die Summe von Phosphatiden und Cholesterin-Estern aufgetragen und auf der Abszisse die Summe von Neutralfetten und freien Fettsäuren. Beide Koordinaten entsprechen % der Gesamtlipoide. Die Auswahl und Auswertung der Versuche wurde in gleicher Weise vorgenommen, wie bei der *Abb. 1* beschrieben wurde. Aus der *Abb. 2* ist klar ersichtlich, daß die Summe von Phosphatiden und Cholesterin-Estern zur Summe von Neutralfetten und freien Fettsäuren in direktem, linearem Abhängigkeitsverhältnis steht.

Zusammenfassung.

1. Mit Hilfe chromatographischer Adsorptionsmethoden werden unter Benutzung einer Zucker- und einer Aluminiumoxydsäule die Gesamtlipoide des menschlichen Blutserums in Phosphatide, Cholesterin-Ester, Neutralfett, freies Cholesterin, freie Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe und Wachse und in eine Stoffgruppe unbekannter Natur getrennt und die einzelnen Stoffe quantitativ bestimmt.

2. Der Gehalt des Nüchternserums gesunder Versuchspersonen an den einzelnen Stoffen wurde bestimmt.

3. Auf der Höhe der Dünndarmverdauung kommt es bei gesunden Versuchspersonen zur Zunahme der Gesamtlipoide im Serum, durch Anwachsen der Phosphatide und der Cholesterin-Ester. Dabei sinken die freien Fettsäuren im Serum auf den Wert 0 ab. Die übrigen dabei bestimmten Stoffe erfahren keine Änderung.

4. Zwischen Phosphatid- und Cholesterin-Ester-Gehalt des Serums bestehen Zusammenhänge derart, daß ein hoher Phosphatidgehalt einem niedrigen Cholesterin-Ester-Gehalt koordiniert ist und umgekehrt. Das Abhängigkeitsverhältnis ist nicht linear, die Summe beider Stoffe ist nicht konstant.

5. Die Summe der Menge an Phosphatiden und Cholesterin-Estern im Serum steht in linearem Abhängigkeitsverhältnis zum Gehalt an Neutralfetten und freien Fettsäuren.

6. Bei der Regulierung des gefundenen Gleichgewichtes haben Cholesterin-Ester und freie Fettsäuren vielleicht eine besondere, bisher unbekannte Bedeutung.

Literatur.

[1] Schoenheimer and Sperry: J. of Biol. Chem. **106**, 745 (1934). — [2] Schmidt-Thomée, J., u. H. Augustin: Hoppe-Seylers Z. **275**, 190 (1942). — [3] Quantitative Clinical Chemistry Interpretations Vol. I by I. P. Peters and D. D. van Slyke. II Edition. London: Balière, Tindall and Cox 1946. — [4] Peters, I. P., and E. B. Man: J. Clin. Invest. **22**, 707 (1943); zit. nach 3. — [5] Bloor, W. R.: J. of Biol. Chem. **77**, 53 (1928). — Kathen, H.: Arch. Mikrobiol. **14**, 602 (1949). — [7] Schulze, G., u. H. Südhof: Hoppe-Seylers Z. (im Druck). — [8] Bloor, W. R.: J. of Biol. Chem. **25**, 577 (1916). — [9] Boyd, E. M.: J. of Biol. Chem. **101**, 323 (1933). — [10] Corcoran, A. C., and I. M. Robinowitch: Biochemic. J. **31**, 343 (1937). — [11] Hiller, A., G. C. Linder, C. Lundsgaard and D. D. van Slyke: J. of Exper. Med. **39**, 931 (1924). — [12] Stanford and Wheathley: Biochemic. J. **19**, 706 (1925). — [13] Ann. Review of Biochemistry Vol. IX, 119 (1940). — [14] Ann. Review of Biochemistry Vol. XV, 110 (1946). — [15] Seckfort, H.: Klin. Wschr. **1949**, Heft 35/36, 589. — [16] Trappe, W.: Biochem. Z. **306**, 316 (1940). — [17] Fritze, E., F. v. Zezschwitz u. G. Schulze: Klin. Wschr. **1950**, Heft **25/26**. — [18] Man, E. B., and E. F. Gildea: J. of Biol. Chem. **99**, 61 (1932); zit. nach 3.

Dr. Günter Schulze, Medizinische Univ.-Klinik, Göttingen.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 481—489 (1952).

Aus dem Röntgeninstitut des Hauptstädtischen Koranyi-Krankenhauses Budapest (Leiter: M. Fóti).

Pharmakodynamische Passage-Untersuchungen an Hunden in Zusammenhang mit der Durchschneidung des Plexus mesentericus sup.

Von
M. Fóti.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. November 1951.)

Die Wirkung der vegetativen Nerven auf die Magen- und Darmmotilität ist noch ungeklärt. Da hierüber im Schrifttum widersprechende Angaben veröffentlicht werden, stimmt die Wirkung der am Krankenbett verwendeten Arzneimittel mit unseren pharmakologischen Kenntnissen nicht überein.

Um dem Problem näher zu kommen, wurden an Hunden vergleichende pharmakodynamische Röntgen-Passageuntersuchungen in Zusammenhang mit Durchschneidung des Plexus mesentericus superior angestellt. Der Tätigkeit des Pylorus und der Bauhinschen Klappe wurde eine besondere Beachtung geschenkt, einmal, weil diese Funktionen in bezug auf die Motilität eine Schlußfolgerung gestatten, zum anderen, weil die reflektorische Funktion der zwei Klappen noch nicht vollkommen geklärt ist. Unsere Untersuchungen wurden in 5 Serien ausgeführt.

Begonnen wurde mit Passageuntersuchungen ohne Arzneimittel. Diese Versuche waren notwendig, da Hunde auf Reize mit einer verschiedenen Motilität ansprechen und zur Auswertung der Arzneiwirkung die Kenntnis der Norm unbedingt erforderlich ist, um so mehr, als die einschlägige Literatur wenige und zum Teil widersprechende Ergebnisse enthält. Bei allen Tieren wurden normale Passageuntersuchungen *wiederholt* ausgeführt.

Danach wurde die Wirkung der auf die vegetativen Nerven wirkenden Mittel Acetylcholin, Atropin und Prostigmin (Neostigmin) geprüft.

In der dritten Serie der Versuche wurde der Plexus mesentericus sup. durchschnitten oder über eine 5—6 mm lange Strecke ausgeschnitten. Der Eingriff wurde von Dr. D. Fehér, Assistent an der Chirurg. Klinik der Veterinärmedizinischen Fakultät, durchgeführt. Die Operationen wurden gut vertragen; die Wundheilung erfolgte ohne Komplikationen in 8—10 Tagen.

In der 4. und 5. Serie folgten an den operierten Tieren vergleichende Untersuchungen ohne und mit Arzneidarreichung. Sie wurden sofort nach der Wundheilung in Angriff genommen, damit die Ergebnisse nicht durch eine eventuelle Nervenregeneration gestört würden. Zwischen den einzelnen Versuchen wurde eine Pause eingeschaltet, in deren Verlauf der Kontrastbrei restlos entleert wurde.

Im Schrifttum begegnete uns keine ähnliche Untersuchung. Bekanntlich prüfte Magnus die Magen-Darm-Motilität bei Katzen und Carlin die Magenmotilität bei Hunden. Pharmakodynamische Untersuchungen wurden an verschiedenen Tieren in einer sehr hohen Anzahl ausgeführt und fast ebenso hoch ist die Zahl jener Versuche, in deren Verlaufe der Vagus oder der Sympathicus oder beide Nerven durchschnitten wurden. Diese Versuche bilden die Grundlage unserer physiologischen Kenntnisse, obwohl sie einige Fehlerquellen aufweisen. Sie erstreckten sich auf einzelne Abschnitte; die Bauchdeckenfenstermethoden schaffen pathologische Verhältnisse, bei denen die richtigen Grundlagen eines Vergleichs fehlen. Dagegen ermöglicht die radiologische Untersuchung die Analyse aller in der Motilität mitspielenden Faktoren.

Das Gewicht der von uns benutzten 4 Tiere war 5, 6, 8 und 10 kg. Die Zahl der Versuchstiere ist gering, doch wurden in mehreren Serien Hunderte von Durchleuchtungen ausgeführt und 104 Aufnahmen angefertigt.

Die verwendete Menge des Kontrastmittels betrug je nach dem Gewicht des Hundes 100—150 cm^3 einer 10%igen Suspension von „Novobarium“ und wurde durch eine Sonde eingeführt. Die Röntgenuntersuchung erfolgte in stehender und liegender Seitenlage, Bauch- und Rückenlage, dann wurde das Tier auf zwei Beine gestellt und mit der postero-anterior Strahlenrichtung durchleuchtet. Die wiedergegebenen Aufnahmen wurden — mit Ausnahme von Abb. 5 — auf dem Trochoskop in Rückenlage der Tiere mit einer p.-a. Strahlenrichtung angefertigt. Vor der Untersuchung hungerten die Tiere 20 Std. Bei der Besprechung der Ergebnisse verwenden wir die für die Humanmedizin angenommene Nomenklatur.

I. Arzneifreie Untersuchungen.

Die arzneifreien prä- und postoperativen Passageuntersuchungen weisen keine auffallenden Unterschiede auf (Tab. 1). Die Abweichung

Tabelle 1. *Passage-Zeit ohne Arzneimittel vor und nach Operation.*

Gewicht des Versuchshundes	Magenentleerung		Anfang des Breies in Coecum		Anfang des Breies in Ampulla	
	vor Operation	nach Operation	vor Operation	nach Operation	vor Operation	nach Operation
5 kg	1^{40} h	1^{45} h	2^{10} h	1^{45} h	4^{30} h	4^{20} h
6 kg	1^{35} h	1^{40} h	2^{00} h	1^{40} h	4^{30} h	4^{30} h
8 kg	1^{10} h	1^{15} h	2^{00} h	1^{45} h	4^{53} h	4^{30} h
10 kg	1^{20} h	1^{30} h	1^{40} h	1^{25} h	5^{00} h	4^{40} h
Durchschnittszeit	1^{26} h	1^{32} h	1^{57} h	1^{39} h	4^{45} h	4^{30} h

der Magenentleerung beträgt im Mittel 6 min, wie sie auch normalerweise bei den unter identischen Bedingungen ausgeführten Versuchen vorkommt. Im Gegensatz dazu ist die evakuierende Motilität des Dünndarms nach der Operation etwas lebhafter. Der Unterschied beträgt im Durchschnitt 18 min. Diese Beschleunigung der Dünndarmmotilität wirkt sich noch auf die Dickdarmpassage aus. Sonst ist die Dickdarmmotilität und Peristaltik unverändert. Demnach hat die Durchschneidung des Plexus mesent. sup. eine leichte Steigerung der Dünndarmmotilität zur Folge, während die Motilität des Magens und des Dickdarms unbeeinflußt bleiben.

Koennecke und Mayer beobachteten bei Hunden nach Durchschneidung der oberen Splanchnici eine Tonussteigerung des Magens und beschleunigte Entleerung. Cannon fand bei Katzen nach derselben Operation keine Änderung. Unsere Ergebnisse stimmen sonach mit denen Cannons überein. Gegenüber sonstigen Widersprüchen (Pohl, Morat usw.) haben unsere Untersuchungen gezeigt, daß die Dünndarmmotilität gesteigert wird, die Dickdarmtätigkeit aber sich kaum ändert.

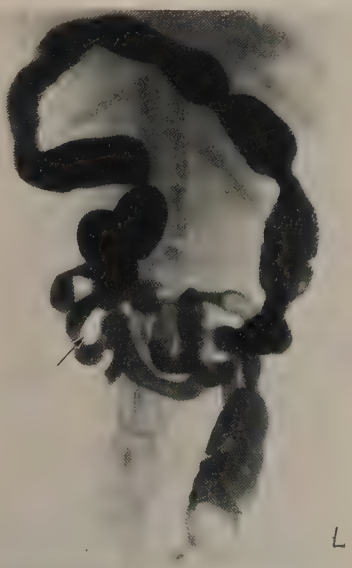


Abb. 1. 4 Std nach der Kontrastmahlzeit, vor der Operation. Wenig Brei in den unteren Ileumschlingen, seine Hauptmasse im prall gefüllten Colon, beginnende Sigmafüllung. Pfeil bei der Grenze von Dünn- und Dickdarm, klare Lumendifferenz und zirkuläre Verengung an der Grenze (entsprechend der beim Hund fehlenden Bauhinischen Klappe). Klare Colonhaustration und peristaltische Wellen.

II. Atropin.

Die pharmakologische Wirkung des Atropins wurde selbst durch die Forschungen der letzten 30 Jahre nicht geklärt. Vor 30 Jahren standen die Ergebnisse von Le Heux im Vordergrund des Interesses; er glaubte die zwischen Reizung und Lähmung bestehenden Widersprüche gelöst zu haben. Er konnte am Darm, wie Hecht am Magen, nachweisen, daß die lähmende Wirkung kleiner Atropindosen nach wiederholtem Auswaschen des Präparates aufhört. Diese Erscheinung wurde auf den Cholingehalt des Präparates zurückgeführt: Enthält der Darm viel Cholin, so übt das Atropin eine beruhigende Wirkung aus; hingegen wirkt das Alkaloid erregend, wenn der Darm wenig oder kein Cholin enthält. Da es sich um überlebende Präparate handelte, sollten Erregung und Lähmung unabhängig vom Vagus und Sympathicus, auf dem Wege über den Auerbachschen Plexus der Magenwand vor sich gehen. Dagegen kam Catel auf Grund seiner eigenen sowie von Katsch und anderen ausgeführten Untersuchungen zur Folgerung, daß das Atropin in gleicher Weise auf die Vagusendigungen *und* den Auerbachschen Plexus wirke. Bei Menschen fand Ötvös nach der subcutanen Injektion von 1 mg Atropin keine wesentliche Änderung des Magentonus und der

-peristaltik; auch die Magenentleerungszeit blieb unverändert. Bei Geschwürskranken blieben Tonus und Peristaltik ebenfalls unverändert, die Magenentleerung aber verzögert. Ötvös legt dieser Verzögerung einen atropinbedingten Pyloruskrampf zugrunde, der auf dem Wege über den Auerbachschen Plexus zustandekomme. Lasch beobachtete, daß die i.v. Verabreichung von 1 mg Atropin beim hypertonischen Magen eine Tonusabnahme und die Verlangsamung der Entleerung zur Folge hatte. Bársony und Friedrich haben diese Versuche nachgeprüft und festgestellt, daß den verschiedenen Ergebnissen die verschiedene Versuchstechnik

Abb. 2.

Abb. 3.

Abb. 2. Vor dem Eingriff, 0,0008 g Atropin s.c., 2 Std post coenam (p.c.). Die Hauptmasse des Kontraststoffes im Magen, eine geringe Menge in den Jejunalschlingen.

Abb. 3. 10 Std. p.c., sonst dieselben Bedingungen. Leerer Magen, zerstreute Breiflecke im Dünndarm, Hauptmasse im Colon.

zugrunde liegt. Eine Pyloruskrampf herbeiführende Wirkung des Atropins haben sie nicht bestätigt; im Gegenteil war in ihren Versuchen der Pyloruskanal nach der Atropinverabreichung oft breiter als vorher.

Wie aus Tab. 2 ersichtlich, fanden wir bei Atropin auffallende Abweichungen. Die präoperative Magenentleerungszeit war annähernd 6 Std, nach der Operation hatte die halbe Atropindose 13 Std Entleerungszeit zur Folge. Die Herabsetzung der Atropindose wurde darum notwendig, weil die Tiere nach der Originaldose den Brei erbrachen bzw. die ganze Breimenge nicht ertrugen. Um das Erbrechen zu verhüten, wurde auch die Breimenge reduziert. Die Beurteilung der Wirkung auf die Dünndarmmotilität ist wesentlich schwerer. Im Laufe der präopera-

tiven Atropinversuche ist der Kontraststoff nach 6 Std 6 min im Blinddarm erschienen. Nach der Operation betrug diese Zeit 14 Std 43 min.

Dieser Unterschied scheint auf den ersten Blick recht groß zu sein. Die Zeitangaben sind aber zum Vergleich nicht geeignet, denn das Erscheinen des Kontraststoffes im Coecum hängt nicht nur von der Dünndarmmotilität ab und die bloße Messung der Zeit, die für die Beförderung des Breis vom Magen bis zum Coecum erforderlich ist, würde zu falschen Ergebnissen führen. In der Motilität spielt auch die Viskosität des Breis eine Rolle. Sie wird von Atropin beeinflußt, da das Alkaloid die Magensekretion herabsetzt. Abb. 4 zeigt, daß die Breiteile, die den Pylorus passiert haben, sich in den oberen Jejunalschlingen nicht anhäufen, sondern — obschon langsam — nach dem Coecum hin befördert werden. Der blasse Breistreifen läßt sich lückenlos hinab verfolgen. Nur wenig Ansammlungen sind zu sehen.

Es wäre unzulässig, die Dünndarmmotilität allein auf Grund der verzögerten Magenentleerung zu beurteilen und die 7stündige Verlangsamung der Magenentleerung von der Erscheinungszeit des Breis im Coecum einfach abzuziehen. Der auf diese Weise erhältliche Unterschied von 1,5 Std würde ein falsches Ergebnis

Abb. 4. Nach der Operation. 0,0004 g Atropin s.c., 8 Std p.c. Halbe Menge von Kontrastbrei; seine Hauptmasse im Magen, blasse Füllung des Jejunums. Ungleichmäßige Konturen (Zahnrad) der großen Kurvatur bis zum Fundus.

Tabelle 2. *Atropin subcutan vor und nach Operation.*

Gewicht des Versuchshundes	Atropindose mg		Magenentleerung		Anfang des Breies in Coecum		Anfang des Breies in Ampulla	
	vor Operation	nach Operation	vor Operation	nach Operation	vor Operation	nach Operation	vor Operation	nach Operation
5 kg	0,5	0,25	6^{00} h	14^{10} h	5^{45} h	16^{30} h	12^{30} h	24^{30} h
6 kg	0,6	0,3	6^{05} h	14^{00} h	6^{30} h	14^{46} h	11^{50} h	22^{10} h
8 kg	0,8	0,4	5^{30} h	12^{30} h	6^{00} h	14^{10} h	11^{10} h	20^{30} h
10 kg	1	0,5	5^{45} h	12^{10} h	6^{10} h	13^{30} h	11^{30} h	21^{00} h
Durchschnittszeit			5^{50} h	13^{10} h	6^{06} h	14^{43} h	11^{45} h	22^{00} h

darstellen, da die Dünndarmpassage — wie erwähnt — auch vor der völligen Entleerung des Magens verfolgt werden kann. Wir glauben also richtig vorzugehen, wenn wir die Dünndarmmotilität nicht zahlenmäßig angeben, sondern lediglich feststellen, daß in den postoperativen Atropinversuchen auch die Dünndarmpassage verzögert war.

Die am Dünndarm gemachten Feststellungen gelten auch vom Dickdarm. Mit Rücksicht auf die 14 Std 43 min, die bis zum ersten Erscheinen des Kontraststoffes im Coecum verstreichen, ist die postoperative Dick-

Abb. 5.

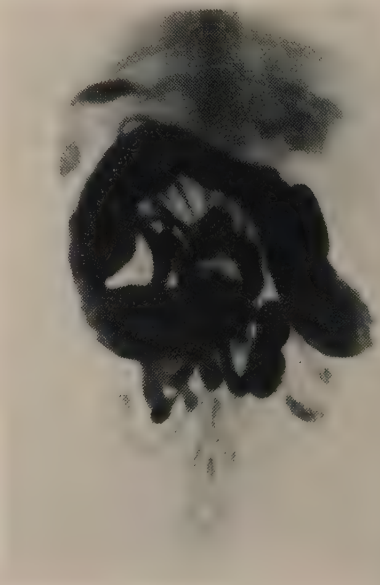


Abb. 6.

Abb. 5. Vor dem Eingriff, 1 cm³ Tonocholin s.c., 30 min p.c. Halbe Breimenge im normotonischen Magen, Füllung des Jejunums.

Abb. 6. Dieselben Bedingungen, 3½ Std p.c. Wenig Brei im Ileum, Hauptmasse im prall gefüllten Colon bis zum Sigma.

darmpassage mit 7 Std 15 min anzugeben, was im Vergleich mit der präoperativen Passage von 5 Std 45 min einer Verlangsamung entspricht.

Sonach lassen sich unsere Versuche wie folgt zusammenfassen: Nach der Durchschneidung des Plexus mesentericus superior kann die Magenmotilität durch Atropin stark herabgesetzt werden. Im Vergleich zur präoperativen Magenmotilität macht sich die Motilitätsabnahme besonders in der Magenentleerung geltend, sie läßt sich aber auch am Dünn- und Dickdarm wahrnehmen.

III. Cholinpräparate.

Cholin und seinen Derivaten kommt eine parasympathicus-erregende Wirkung zu. Im Schrifttum findet man darüber nur wenige mit Röntgenlicht kontrollierte

Untersuchungen; sie beziehen sich auf Menschen. GERKEN konnte die Magen- und Dünndarmperistaltik mit Doryl (Carbaminsäure-Cholinester) heben. Auch NAUMANN beobachtete eine milde erregende Wirkung am ganzen Verdauungstrakt.

Die Prostigminwirkung wurde von STRAUB und seinen Mitarbeitern an Meerschweinchen studiert. Über Hundeversuche fanden wir keine Literaturangabe. STRAUB usw. beobachteten am Dünndarm eine lebhafte motorische Wirkung, hingegen war die Dickdarmwirkung unbedeutend. Cholin und seine Derivate wirken auf die im Darm befindlichen Elemente wie der Vagus; weder wie der Sympathicus noch auf die intramuralen Ganglien üben sie eine Wirkung aus.

Abb. 7.

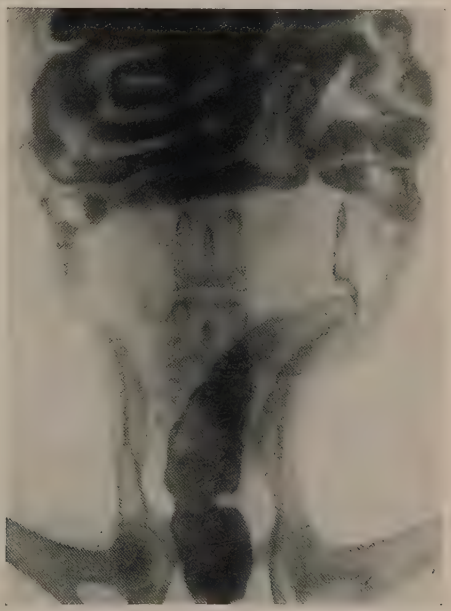


Abb. 8.

Abb. 7. Dieselben Bedingungen, nach dem Eingriff, 30 min p.c. Brei vorwiegend im Magen, wenig im Dünndarm.

Abb. 8. Dieselben Bedingungen, nach dem Eingriff, 3½ Std p.c. Brei zum Teil noch im Ileum, lose gefülltes Colon bis zur Ampulla.

Unsere Cholinversuche sind in Tab. 3 und 4 zusammengestellt. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, kam es nach 100 mg Acetylcholin zu einer ausgesprochenen Tonussteigerung des Magens mit Belebung der Peristaltik; der Pylorus aber scheint erschlafft und auch der Dünndarmtonus herabgesetzt. Der Dickdarm wies keine Funktionsänderung auf. Nach der Operation war die Magenentleerung beinahe unverändert, die 8 min betragende mittlere Beschleunigung ist nicht zu verwerten. Die Beschleunigung der Dünndarmpassage ist mit beinahe 30 min schon wesentlich. Demnach hatte die Operation keine verwertbare Erhöhung der Magenmotilität nach Tonocholin zur Folge, dagegen wurde die Dünndarmpassage erheblich, die Dickdarmpassage weniger beschleunigt. Diese

Unterschiede entsprechen dem bipolaren Mechanismus des vegetativen Nervensystems: nach der Ausschaltung des Sympathicus kommt die durch den Vagus entfaltete Acetylcholinwirkung stärker zur Geltung. Obwohl der gesteigerte Vagustonus eine Herabsetzung der Magenmotilität erwarten ließ, wurde keine solche Wirkung beobachtet, wahrscheinlich wegen des klaffenden Pylorus, dessen Funktion nicht nur dem Vagus, sondern auch Reflexvorgängen unterliegt.

Tabelle 3. *1 cm³ Tonocholin (mit 0,1 g Acetylcholin) subcutan vor u. nach Operation.*

Gewicht des Versuchshundes	Magenentleerung		Anfang des Breies in Coecum		Anfang des Breies in Ampulla	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
	Operation		Operation		Operation	
5 kg	2^{05} h	2^{00} h	2^{30} h	1^{45} h	4^{25} h	3^{25} h
8 kg	1^{55} h	1^{45} h	2^{00} h	1^{50} h	4^{10} h	3^{45} h
Durchschnittszeit	2^{00} h	1^{52} h	2^{15} h	1^{47} h	v 4^{17} h	3^{35} h

Tabelle 4. *1 cm³ Tonocholin (mit 100 mg Acetylcholin) + 1,1 cm³ Prostigmin* Roche *(mit 0,5 mg Substanz) subcutan vor und nach Operation.*

Gewicht des Versuchshundes	Magenentleerung		Anfang des Breies in Coecum		Anfang des Breies in Ampulla	
	vor	nach	nach	vor	vor	nach
	Operation		Operation		Operation	
6 kg	1^{30} h	1^{25} h	2^{00} h	1^{50} h	3^{40} h	3^{50} h
10 kg	1^{20} h	1^{30} h	1^{50} h	1^{50} h	3^{20} h	3^{10} h
Durchschnittszeit	1^{25} h	1^{27} h	1^{55} h	1^{50} h	3^{30} h	3^{20} h

Die in Tab. 4 angeführten Werte wurden nach der gleichzeitigen subcutanen Injektion von 0,1 g Acetylcholin und 0,5 mg Prostigmin erhalten. Die Passagewerte sind prä- und postoperativ gleich und für den ganzen Verdauungstrakt niedriger; mit den postoperativen Werten der vorigen Tabelle (reine Tonocholinversuche) sind sie nahezu identisch. Dies bedeutet, daß das Prostigmin die cholinergische Vaguswirkung beträchtlich erhöht, die Sympathicusdurchschneidung aber diese Wirkung innerhalb gewisser Grenzen weiter zu steigern nicht vermag.

An 2 Hunden haben wir die Tonocholin-Injektion 30 min später wiederholt. Die Motilität wurde hierdurch für einige Minuten — im Vergleich mit der einfachen Tonocholinwirkung — gesteigert, aber wesentlich weniger als durch die gleichzeitige Verabreichung von Tonocholin und Prostigmin. Diese Versuche wurden in der Tabelle nicht angeführt.

Zusammenfassung.

1. Die Motilität des Magen-Darm-Kanals wird durch Atropin herabgesetzt; diese Motilitätsabnahme tritt nach der Durchschneidung des Plexus mesentericus stärker hervor.

2. Die Steigerung der Atropinwirkung nach dem Eingriff entspricht der für das vegetative Nervensystem allgemein gültigen Bipolarität.

3. Unsere Ergebnisse sprechen gegen die Annahme, daß die Atropinwirkung nur auf dem Wege über die intramuralen Ganglien (Auerbachschen Plexus) zustande komme. Die Versuche bestätigen die Behauptung Catels, daß das Atropin „aller Wahrscheinlichkeit nach auf den Vagus und den Auerbachschen Plexus in gleicher Weise wirke".

4. Weder vor noch nach der Operation wurde eine atropinbedingte Muskelhypotonie im Sinne von Klee beobachtet. Im Gegenteil, nach der Operation wies der Magen eine ausgesprochene Hypertonie auf (Abb. 4). Auch die von Barsony und Friedrich beschriebene Muskeldepression wurde nicht beobachtet.

5. Sofern der Geschwürkrankheit eine Dysfunktion des vegetativen Nervensystems zugrunde liegt, stimmen unsere Ergebnisse mit den Untersuchungen von Ötvös überein, der nach der subcutanen Injektion von 1 mg Atropin bei Gesunden eine ungeänderte Magenentleerung, bei Geschwürkranken eine verzögerte Magenentleerung beobachtete. Die Durchschneidung des Plexus mesentericus — wie in unseren Versuchen ausgeführt — hatte eine künstliche Dysfunktion des vegetativen Nervensystems zur Folge.

6. Unsere Ergebnisse sagen nichts aus über die Cholintherapie von le Heux und Hecht.

Literatur.

Bacq et Goffarth: Sch. Med. **1941**, 310. — Bársony u. Friedrich: Dtsch. Arch. klin. Med. **145**, H. 3/4. — Cannon: Amer. J. Physiol. **6**, 251 (1902). — Carlin: Hundemagen im Röntgenbilde. 1928. — Catel: Normale u. Path. Physiologie der Bewegungsvorgänge im gesamten Verdauungskanal. Thieme 1936. — Cohnheim: Physiologie der Verdauung u. Ernährung. Urban & Schwarzenberg 1908. — Cohnheim u. Modrakowski: Z. physiol. Chemie **71**, 273 (1911). — Dietlen: Verh. dtsch. Röntgen-Ges. **7**, 66 (1911). — Elliot: J. of Physiol. **31**, 157 (1904). — Gruber, Thomas, Crider u. Brundage: Ber. Physiol. **95**, 520 (1936). — le Heux u. de Kleyn: Pflügers Arch. **234**, 98 (1934). — Hukuhara: Pflügers Arch. **229**, 311 (1932). — Issekutz: Gyogyszerek és gyogyitas 1948. — Katsch: Z. exper. Path. u. Ther. **12**, 290 (1912/13). — Klee: Pflügers Arch. **145**, 557 (1912). — Koennecke: Z. exper. Med. **28**, 384 (1922). — Lasch: Klin. Wschr. **1922**. — Magnus: Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 36. Kongreß S. 157. 1924. — Müller, L. R.: Das vegetative Nervensystem. Springer 1920. — Naumann: Funktionelle Dünndarmdiagnostik im Röntgenbild. Thieme 1948. — Ötvös: Dtsch. Arch. klin. Med. **1921**. — Raiford u. Mulinos: Ber. Physiol. **92**, 592 (1937). — Ratkóczy: Fortschr. Röntgenstr. **53**, 343 (1936). — Trendelenburg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **81**, 55 (1917).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 490—496 (1952).

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering-A.-G., West-Berlin.

Die Ausscheidung von 17-Ketosteroiden bei der Ratte.*

Von

Hedwig Langecker.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Januar 1952.)

Mit der ACTH- und Cortisonforschung hat die Prüfung der 17-Ketosteroidausscheidung im Harn als Nebennierenfunktionsprüfung große Bedeutung erlangt. Die beim Menschen im Harn auftretenden 17-Ketosteroide bilden einen begrenzten Ausschnitt aus der Gruppe der Steroidhormonschlacken und gelten als Stoffwechselendprodukte von Steroiden aus Hoden und Nebennieren. Sie umfassen androgen wirksame und unwirksame Verbindungen. Man nimmt an, daß Testosteron zu Androsteron abgebaut wird. Über die Nebennierenrindenvorstufen besteht noch Unklarheit. Sayers[1], Mason[2]. Im Verhältnis zu dem umfangreichen klinischen Schrifttum sind Untersuchungen über 17-Ketosteroidausscheidung bei Tieren nicht zahlreich. Mason[2]. Dies nimmt um so mehr Wunder, als gerade Tierversuche durch Ausschaltung bestimmter endokriner Drüsen Aufschluß über die Herkunft der Harnsteroide erwarten lassen.

Methode: Es wurde die in der Hormonforschung viel verwendete Ratte benutzt. 25—30 gleichgeschlechtliche, vom Händler bezogene Ratten im Gewicht von 120—200 g wurden an den Tagen der Harnsammlung in Stoffwechselkäfigen mit einem doppelten Sieb zur Abtrennung von Kot und Harn gehalten und mit einem gießbaren Schleim aus Trinkgefäßen ernährt, deren Mündung außerhalb der Boxen lag, so daß Futterverunreinigungen des Harns vermieden wurden. (Das Futter bestand aus: 25 g Hafermehl, 4 g Garnelen, 4 g Trockenmilch, 4 g Ölsamen, Wasser ad 200 cm^3 für je 4 Ratten.) Die Kastration, einzeitige Nebennierenexstirpation und Hypophysectomie wurde in Äthernarkose ausgeführt. Die nebennierenlosen und hypophysenlosen Tiere wurden bei 25° gehalten, die ersteren erhielten 1% Kochsalz im Futter.

Die Bestimmung der 17-Ketosteroide wurde in einem aliquoten Teil eines Tagesmischharns von 25—30 Ratten nach der Methode von Zimmermann[3] in der Modifikation von Holtdorff[4] ausgeführt und in γ/kg/Tag ausgedrückt. Der Ätherextrakt des Neutralteils wurde zwecks Entfernung der im Harn reichlich vorliegenden Chromogene, entsprechend dem Vorschlag von Dreckter[5], auch noch mit festem Natriumhydroxyd geschüttelt und mit Schwefelsäure bzw. Wasser ausgewaschen. Die Ketonfraktion wurde mittels Girard-T-Reagens (Trimethylaminoacetohydrazid), das mit den Ketonen wasserlösliche und ätherunlösliche Hydrazone bildet, abgeschieden.

* Die Ergebnisse wurden zum Teil auf der Tagung der Pharmakologischen Gesellschaft 1951 in Mainz vorgetragen.

Die colorimetrische Bestimmung geschah zur Verkleinerung des Pipettenfehlers in einem 10fach größeren Ansatz (2 cm^3 alkoholische Ketonlösung wurde mit 2 cm^3 5 n-Lauge und 2 cm^3 m-Dinitrobenzollösung in einem Meßkölbchen nach 105 min mit Methylalkohol [acetonfrei] auf 50 cm^3 aufgefüllt) im HAVEMANN-Colorimeter (30 cm^3 Küvette, Grünfilter VG 2) unter Benutzung einer Androsteronstandardkurve. Zusatzversuche mit reinem Androsteron fielen befriedigend aus. Mit einem Spektralfilter (520 $m\mu$) konnte neuerdings in Vergleichsversuchen an normalen Ratten eine gute Übereinstimmung mit den unter Verwendung des Grünfilters VG 2 ermittelten Werten festgestellt werden.

Ergebnis.

Normale männliche Tiere schieden 80—160 γ/kg/Tag aus, die weiblichen 110—190 γ. Zur Feststellung der Beziehung zwischen Alter und 17-Ketosteroidausscheidung wurde an je 30 Ratten beiderlei Geschlechts, ausgehend von einem Durchschnittsgewicht von 88 g bis zu einem Gewichtsanstieg auf 150 g, die Ausscheidung verfolgt, ohne daß eine Änderung der Ausscheidung auftrat. Man ist demnach in diesen Gewichtsklassen der Ratten vom Körpergewicht nicht abhängig.

Nach Kastration war nur in einem von 3 Versuchen bei männlichen Tieren (Nr. 1) bereits in der zweiten Woche eine Abnahme zu sehen. In Versuch Nr. 2 kam es erst nach 6 Wochen zu einer geringen Abnahme. Bei weiblichen Tieren war in 3 von 4 Versuchen (Nr. 1, 4, 5) schon in der ersten Woche nach der Kastration eine Abnahme festzustellen.

Eine Gruppe männlicher Ratten mit dem Ausgangswert von 100 γ je Tag zeigte nach der Kastration, über 11 Wochen hin verfolgt, folgende Ausscheidung: (in der Klammer: der Tag nach der Kastration) 110 γ (2), 100 γ (3), 110 γ (16), 110 γ (17), 110 γ (30), 110 γ (31), 70 γ (58), 80 γ (59), 60 γ (79), 60 γ (80).

Eine Gruppe weiblicher Ratten mit einem Ausgangswert von 150 γ je Tag zeigte nach der Kastration über 11 Wochen hin verfolgt, folgende Ausscheidung: 120 γ (2), 120 γ (3), 100 γ (16), 120 γ (17), 100 γ (30), 110 γ (31), 110 γ (49), 90 γ (50), 70 γ (79), 90 γ (80).

Die Nebennierenexstirpation führte bei 2 Gruppen männlicher Ratten (Vers. Nr. 4, 5) zu einer geringen Zunahme der 17-Ketosteroidausscheidung, bei 2 weiblichen Gruppen (Nr. 2, 3) trat in einem Fall eine geringe Senkung auf (Nr. 2).

Nebennierenexstirpation bei männlichen Kastraten führte in 2 Gruppen (Vers. Nr. 1, 2) sofort zu einer Abnahme, die etwa zwei Wochen anhielt.

Bei zwei Gruppen weiblicher Ratten (Nr. 1, 4) war unter denselben Versuchsbedingungen sofort eine Abnahme zu sehen, in der dritten Gruppe (Nr. 6) war die Reaktion geringer. Auch hier stiegen die Werte in der dritten Woche wieder an.

Hypophysektomie führte bei einer Gruppe männlicher (Vers. Nr. 3) und weiblicher (Nr. 5) Kastraten zu einer Abnahme der 17-Ketosteroidausscheidung.

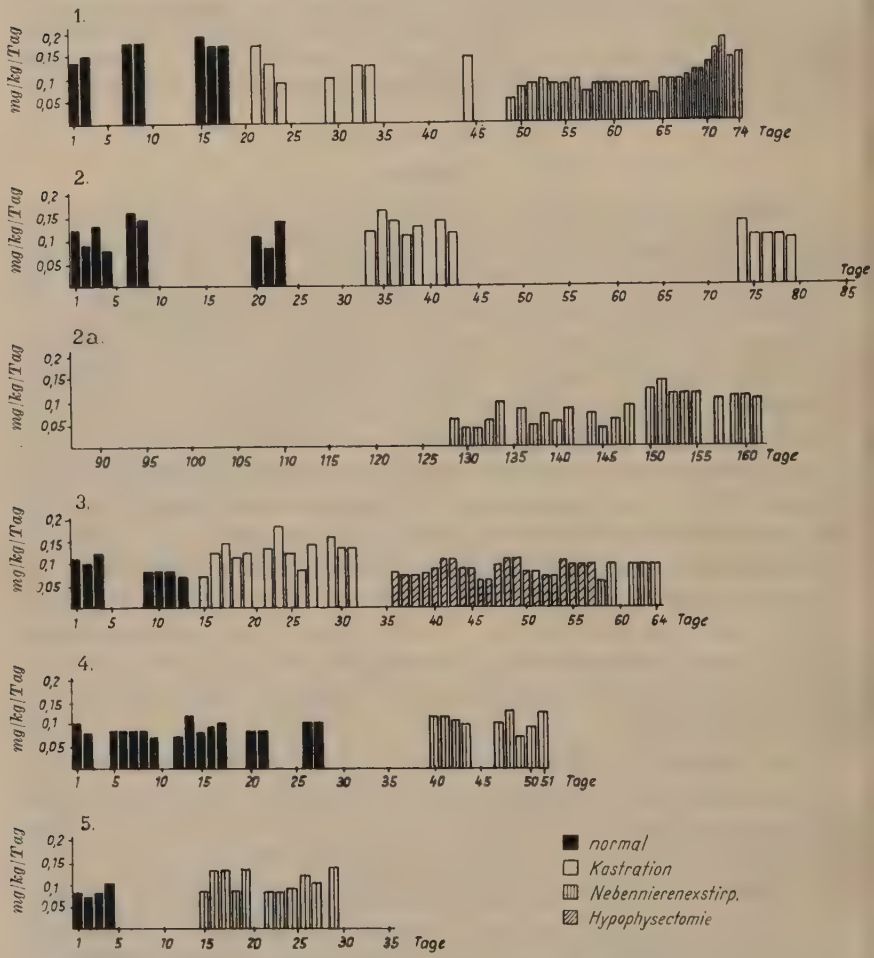


Abb. 1. 17-Ketosteroidausscheidung im Harn bei männlichen Ratten. (γ/kg/Tag.)

Nr.	Normaltiere		Kastraten		Nebennierenlose		Hypophysenlose Kastraten		Nebennierenlose Kastraten		Hypophysenlose nebennierenlose Kastraten	
	m	ε	m	ε	m	ε	m	ε	m	ε	m	ε
1	170	6	120	11					80	3		
2	120	10	130	7					80	7		
3	90	7	130	8			90	4			90	10
4	90	4			110	6						
5	80	6			110	5						

Auch nach Nebennierenausschaltung bei Kastraten blieb in den ersten 2 Wochen eine 17-Ketosteroidausscheidung nachweisbar, die etwa

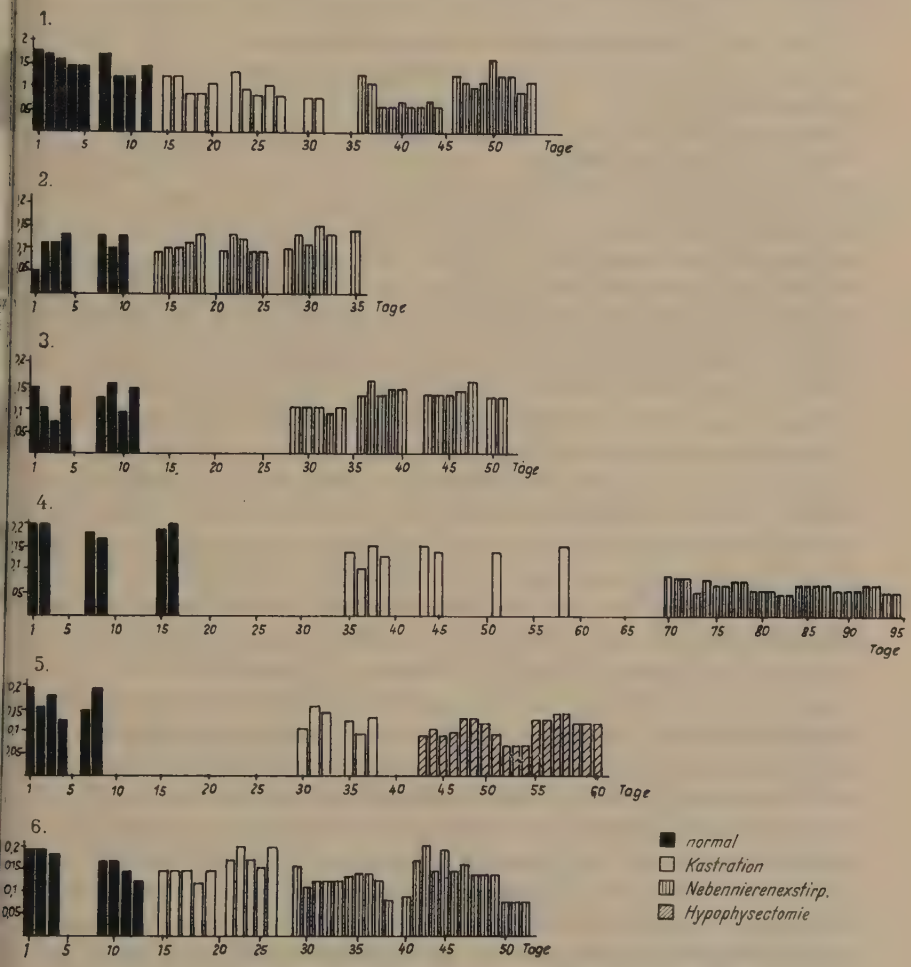


Abb. 2. 17-Ketosteroidausscheidung im Harn bei weiblichen Ratten. (γ/kg/Tag.)

Nr.	Normaltiere		Kastraten		Nebennierenlose		Hypophysenlose Kastraten		Nebennierenlose Kastraten	
	m	ε	m	ε	m	ε	m	ε	m	ε
1	150	8	90	6					70	8
2	110	11			100	5				
3	120	11			120	5				
4	190	5	140	6					70	2
5	160	12	120	9			100	6		
6	160	10	150	8					120	6

50% des Normalwertes betrug (Nr. 1 und 2 bei männlichen Ratten, Nr. 1 und 4 bei weiblichen Ratten).

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Nach Dorfmann[6] gehört die Ratte zu den Tieren mit niedriger 17-Ketosteroidausscheidung.

Danford[7] fand bei 120 g schweren Tieren 210—280 γ/kg/Tag im Vergleich zu unseren Werten fast das Doppelte. Kowalewski[8a] fand bei weiblichen Ratten von 210—295 g 330 γ 17-Ketosteroid/Tag. — Bei den männlichen Ratten ist die Streuung der Durchschnittswerte in den einzelnen Gruppen beträchtlich und steht in keinerlei Beziehung zum Körpergewicht. Die Ausscheidung der 17-Ketosteroide ist bei weiblichen Ratten überraschenderweise höher als bei den Männchen. Aus den Kurven der Arbeit Neukamm[9] über die 17-Ketosteroidausscheidung nach Methylcholanthren bei Ratten erkennt man, daß die Werte der weiblichen Tiere höher liegen als die der männlichen. Paschkis[10] hat beim Hund keinerlei Unterschiede in der 17-Ketosteroidausscheidung bei Männchen und Weibchen gefunden. Glenn und Heftmann[11] fanden bei weiblichen Hunden höhere Werte als bei männlichen.

Unter unseren Versuchsbedingungen waren keine Beziehungen zwischen 17-Ketosteroidausscheidung und Diureseschwankungen zu erkennen.

Die Kastration war bei den Männchen in den ersten 6 Wochen ohne Einfluß. Man könnte annehmen, daß die Nebenniere kompensatorisch einspringt oder daß Vorstufen aus den Hoden noch lange kreisen. Beim Menschen nimmt man an, daß ⅓ der 17-Ketosteroid-Vorstufen aus den Hoden stammt. Dorfmann[12] beobachtete bei männlichen Affen nach Kastration erst von der 3. Woche an eine deutliche Senkung der 17-Ketosteroidausscheidung bis auf 50%. Merkwürdigerweise war bei weiblichen Ratten der Einfluß der Kastration in 3 von 4 Versuchen deutlich ausgesprochen. Bei der Frau wird der Anteil ovarieller 17-Ketosteroid-Vorstufen sehr gering bewertet. Dorfmann[12] fand bei weiblichen Affen nach Kastration die 17-Ketosteroidausscheidung fast unverändert.

Der geringe Anstieg der 17-Ketosteroidausscheidung nach Nebennierenexstirpation bei männlichen Ratten spricht für einen kompensatorischen Vorgang, der bei den weiblichen Tieren fehlt. Außerdem bleiben im Körper offenbar Corticosteroide kreisend, denn die nebennierenlose Ratte verträgt den Kältetest eine gewisse Zeit. (Sellers und Newel Thomas[13].) Die Ausbildung akzessorischer Nebennieren bei der Ratte von der 3. Woche an verhindert die Beobachtung über längere Zeiträume. Während man beim Menschen den Nebennierenvorstufen eine große Bedeutung für die 17-Ketosteroidausscheidung zuschreibt, überrascht der geringe Einfluß der Nebennierenexstirpation in den untersuchten Zeiträumen bei der Ratte. Bei Addison-Kranken beiderlei Geschlechts werden auffallend niedrige Werte gefunden. Dorfmann[12] fand bei männlichen und weiblichen Affen schon vom 2.—5. Tag an bereits erhebliche Abnahmen, woraus er schließt, daß die Gonaden nach Nebennierenexstirpation nicht mehr optimal arbeiten.

Auf Unterschiede im Stoffwechsel der Androgene zwischen Mensch und Ratte weist auch die Tatsache hin, daß der Anteil von Dehydroandrosteron an der 17-Ketosteroidausscheidung mit der nach Munson[14] modifizierten Pettenkoferschen Reaktion, die für Dehydroandrosteron spezifisch ist, weniger als Zehntel Prozente beträgt; wir erhielten niemals eine positive Reaktion in der Ketonfraction, während beim Menschen nach Landau[15] 10—15% der 17-Ketosteroide Dehydroandrosteron sind.

Ferner nahm in einer Gruppe von 12 männlichen Ratten nach ACTH-Behandlung (100 Milli E — 2 Einheiten je Tag und Ratte durch 3 Wochen) — die 17-Ketosteroidausscheidung nicht zu, sondern vorübergehend ab. Versuche mit einem ACTH-Depot wären noch erforderlich.

Zizine[16] konnte an der Ratte mit reinem ACTH keine androgenen Wirkungen hervorrufen. Kowalewski[80] hingegen hat mit offenbar extrem hohen Dosen ACTH (1,5 mg/Ratte) bei normalen und hypophysenlosen Tieren die 17-Ketosteroidausscheidung steigern können.

Nach Glenn und Heftmann[11] beeinflußt ACTH beim Hund die 17-Ketosteroidausscheidung nicht.

Für ein Zusammenspiel von Keimdrüsen und Nebennieren hinsichtlich der Bereitstellung von 17-Ketosteroid-Vorstufen spricht, daß die Nebennierenexstirpation an Kastraten — und ähnliches gilt für die hypophysenlosen Tiere — zu einer ausgesprochenen Abnahme der 17-Ketosteroidausscheidung führt. Der verbleibende Rest beträgt immer fast 50% des Normalwertes. Dorfmann[6] fand bei männlichen und weiblichen kastrierten Affen nach Nebennierenextirpation noch 30—40% 17-Ketosteroidausscheidung.

Zur Beurteilung, wie weit exogene Quellen „17-Ketosteroide" bereitstellen, wurde Futter und Kot im gleichen Analysengang untersucht. Die Tagesaufnahme einer Ratte entspricht einem Farbwert von etwa 200 γ/kg/Tag, im Kot werden davon 40—60 γ wiedergefunden. Dieser von außen aufgenommene Anteil an „17-Ketosteroiden" erschwert die Beurteilung der Vorstufen der 17-Ketosteroide. Nach Landau[15] nimmt beim Menschen schon nach dreitägigem Fasten die 17-Ketosteroidausscheidung ab. Er glaubt nicht an einen alimentären Vorstufenmangel, sondern an einen indirekten Einfluß der gestörten Leberfunktion.

Bei der Ratte ist demnach die 17-Ketosteroidausscheidung von geringer Spezifität. Die kleinen Mengen lassen eine biologische Prüfung kaum durchführen. Es müßte durch die Aufnahme der Absorptionsspektren bzw. mit chromatographischer Aufteilung klargestellt werden, ob die gefundenen Farbwerte mit denen beim Menschen beobachteten übereinstimmen.

Da nach Clayton[17] beim Meerschweinchen unter Skorbut-Diät die 17-Ketosteroidausscheidung bis zum Tode ansteigt, scheint beim Meerschweinchen eine gesteigerte Nebennierenrindenfunktion mit einer

Zunahme von 17-Ketosteroiden im Harn einherzugehen, d. h. der Abbau von Nebennierenrindenhormonen zu 17-Ketosteroiden zu führen; vgl. hingegen Banergee[18].

Bildung und Abbau der 17-Ketosteroide sind bei der Ratte schwer zu übersehen. Während Kastration und Nebennierenexstirpation allein kaum Veränderungen zur Folge haben, führt Nebennierenexstirpation an Kastraten zu deutlicher Abnahme. Da nebennierenlose Ratten nur geringe Veränderungen der 17-Ketosteroidausscheidung zeigen, kann nicht die herabgesetzte Vitalität die Ursache sein. Es muß demnach bei der Ratte Bildung und Abbau der 17-Ketosteroid-Vorstufen von einer Keimdrüsen-Nebennierenkorrelation abhängen.

Die Versuchsergebnisse besagen, daß im Abbau der Androgene zwischen Ratte und Mensch Unterschiede bestehen und man wird in diesem Teil des Steroidstoffwechsels die Spezies beachten müssen.

Zusammenfassung.

Es wurde an normalen, kastrierten, nebennierenlosen und hypophysenlosen Ratten beiderlei Geschlechts die 17-Ketosteroidausscheidung untersucht. Während die Kastration oder die Nebennierenexstirpation die 17-Ketosteroidausscheidung kaum beeinflußt, sinkt sie an nebennierenlosen bzw. hypophysenlosen Kastraten sofort ab. Es bleiben etwa 50% übrig. Dehydroandrosteron konnte in der 17-Ketosteroidfraktion nicht nachgewiesen werden. ACTH-Belastung (bis 2 E/Tag/Ratte) bewirkt keine Steigerung. Es bestehen danach zwischen Mensch und Ratte Unterschiede hinsichtlich der Bereitstellung der 17-Ketosteroid-Vorstufen, deren Bedeutung diskutiert wird.

Literatur.

[1] Sayers, G.: Physiologic. Rev. **30**, 241 (1950). — [2] Mason, H. L., and W. W. Engstrom: Physiologic. Rev. **30**, 321 (1950). — [3] Zimmermann, W.: Z. physiol. Chem. **233**, 257 (1935); **245**, 47 (1936). — [4] Holtorff, A. F., and F. C. Koch: J. of Biol. Chem. **135**, 377 (1940). — [5] Drekter, I. J., S. Pearson, E. Abrtczak and T. H. McGavack: J. Clin. Endocrinology **7**, 795 (1947). — [6] Dorfmann: The Hormones Vol. I, 516. New York: Gr. Pincus u. K. V. Thimann Acad. Press. 1948. — [7] Danford, P. A., and H. G. Danford: J. Amer. Phys. **164/3**, 690 (1951). — [8] Kowalewski, K., and P. A. Bastenie: Ann. Endocr. **11**, 284 (1950). — [8] Kowalewski, K., P. A. Bastenie et H. Drzewicka: C. r. Soc. Biol. Paris **145**, 769 (1951). — [9] Neukamm, S.: Exper. VII, 230 (1951). — [10] Paschkis, zit. bei Mason, siehe 2, 372. — [11] Glenn, E. M., and E. Heftmann: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **77/1**, 147 (1951). — [12] Dorfman, R. I., B. N. Horwitt, R. A. Shipley, R. Fish and W. E. Abbott: Endocrinology **41**, 470 (1947). — [13] Sellers, E. A., and T. Newell: Amer. J. Physiol. **165**, 481 (1951). — [14] Munson, P. L., M. E. Jones, P. J. McCall and T. F. Gallagher †: J. of Biol. Chem. **176**, 73 (1948). — [15] Landau, R. L., K. Knowlton, D. Anderson, M. B. Brandt and A. T. Kenyon: J. Clin. Endocrinology **8**, 133 (1948). — [16] Zizine, L.: Presse Méd. **59**, No. 53, 1096 (1951). — [17] Clayton, B. E., and F. T. G. Prunty: Brit. Med. J. **1951**, 930. [18] S. Banergee u. Ch. Deb: J. Biol. Chem. **194**, 575 (1952).

Prof. Dr. Hedwig Langecker, Berlin N 65, Schering A.-G.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214. S. 497—500 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium
der Firma H. Lundbeck & Co. A.-G., Kopenhagen.

Zur quantitativen Bestimmung sedativer Wirkungen im Tierversuch.

Von
HANS WEIDMANN.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. Februar 1952.)

Zahlreiche klinische Arbeiten weisen auf eine zentrale Wirkungskomponente der Antihistaminica hin, welche in therapeutischen Dosen vor allem in einer sedativen Wirkung zum Ausdruck kommt. Demgegenüber finden sich nur wenige tierexperimentelle Untersuchungen über diese zentral depressive Wirkung der Stoffe vor. Die Gründe dafür liegen — jedenfalls zum Teil — in der Schwierigkeit der quantitativen Erfassung sedativer Effekte bei Tieren.

Einzelne Autoren neigen sogar zu der Auffassung, daß die Antihistaminica wohl beim Menschen, nicht aber bei Tieren sedativ wirken (FEINBERG 1950; LEONARD und HUTTRER 1950).

WINTER (1948) konnte nach oraler und parenteraler Verabreichung verschiedener Antihistaminica an Maus, Ratte, Meerschweinchen, Hund und Affe keinen sedativen Effekt beobachten. Er erklärt dies damit, daß die den Stoffen ebenfalls eigene erregende Komponente die sedative Wirkung verdeckt. Dagegen wiesen er sowie ABBOZZO und Mitarbeiter (1951) eine Verstärkung der hypnotischen Wirkung von Barbituraten bzw. Avertin durch Histaminantagonisten nach. Zufolge Untersuchungen von MACHT und HOFFMASTER (1948) und WINTER und FLATAKER (1949; 1951) zeigen trainierte Ratten nach Verabreichung von Antihistaminica eine Verlängerung der zum Erklettern eines Seiles benötigten Zeit. Beide Methoden scheinen zur Bestimmung sedativer Wirkungen bzw. zur Testierung neuer Verbindungen auf ihren möglichen sedativen Effekt unbefriedigend. Die erstgenannte, weil sie keine unmittelbaren Werte liefert, die zweite wegen der Komplexität der Beeinflussungsmöglichkeiten psychisch-physischer Vorgänge.

Wir haben deshalb versucht, die mit Hilfe einer seit langem bekannten, an sich bewährten Methode erhaltenen Resultate einer quantitativen Auswertung zugänglich zu machen. Es ist auf diese Weise nicht nur gelungen, die sedative Wirkung von Antihistaminkörpern quantitativ zu bestimmen; die Methode hat sich auch für Reihenuntersuchungen als geeignet erwiesen.

Methode.

Zur Bewertung der sedativen Wirkung wurde die Beeinflussung der spontanen Bewegungen von Mäusen herangezogen. Zu diesem Zwecke wurden die Versuchstiere in einen „Zitterkäfig" gebracht (es handelt sich bei der von uns verwendeten

Apparatur um eine Modifikation der erstmals von Schlagintweit (1928) angegebenen Einrichtung zur fortlaufenden Registrierung der spontanen Motilität von Mäusen) und ihre Bewegungen kymographisch registriert. Gruppen von Tieren wurden mit abgestuften Dosen des zu untersuchenden Stoffes injiziert und die Anzahl der mit Beruhigung reagierenden Tiere jeder Gruppe an Hand der erhaltenen Kurven bestimmt. Ohne Zweifel basieren die so erhaltenen Daten auf der für biologische Auswertungen charakteristischen normalen Häufigkeitsverteilung. Die Beurteilung der Resultate erfolgt in einfachster Weise, indem die Wirkung als „Alles oder Nichts" im Charakter angesehen wird. Bei einem solchen Vorgehen erhält man die in Tab. 1 wiedergegebenen, für eine Alles-oder-Nichts-Reaktion typischen Daten. Die Werte kommen auch auf eine Gerade zu liegen, wenn der Prozentsatz der „positiv" reagierenden Tiere in Probits, die Dosen in Log-Dosen transformiert werden. Die statistische Analyse ergab für keine der untersuchten Substanzen bzw. deren ermittelte Punkteschar ein signifikantes Abweichen von der Linearität (vgl. auch Abb. 1).

Tabelle 1.

Dosis mg/kg	Anzahl „positiv" reagierende/Anzahl injizierte Tiere		
	Phenergan	Benadryl	N 74
3,8	—	—	1/8
5,3	—	—	6/18
7,5	0/8	1/10	4/10
11,0	1/8	3/12	5/8
15,0	2/8	3/8	6/8
21,0	8/16	4/10	8/8
30,0	7/12	0/16	—
42,0	7/8	0/8	—

Der Vorteil des Vorgehens liegt in erster Linie darin, daß die Bewertung der Reaktion auf Grund des gewählten Alles-oder-Nichts-Charakters einfach und scharf definiert ist. Ab und zu auftretende fragliche Reaktionen wurden als negativ bewertet. Ferner wird zur Berechnung der Resultate die Heranziehung heute allgemein gebräuchlicher Methoden ermöglicht.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: Um die Kurve des normalen Ablaufes der Spontanbewegungen zu erhalten, wurden die Mäuse (im Gewicht von 20—24 g) zunächst 15 min unbeeinflußt im Zitterkäfig gehalten. Tiere, welche während dieser Zeit ungenügende Spontanbewegungen zeigten, wurden verworfen. Darauf wurde die zu prüfende Substanz intraperitoneal injiziert und die Motilität des Tieres während weiterer 30 min auf dem Kymographen registriert. Der Dosenbereich erstreckte sich von 3,8—42,0 mg/kg. Die Abstufung der Dosen erfolgte in geometrischer Reihe (Quotient $\sqrt{2}$). Pro Dosis kamen 8—18, pro Substanz etwa 60 Tiere zur Verwendung. Die injizierte Menge betrug stets 0,01 ml/g Maus. Die statistische Analyse der Resultate erfolgte nach Finney (1947). Bestimmt wurde die mittlere sedative Dosis (SD_{50}) sowie deren Fiduzialgrenzen bei einer Wahrscheinlichkeit von 0,95.

Damit die Beurteilung der Kurven mit genügender Sicherheit erfolgen kann, müssen zwei Voraussetzungen gegeben sein: 1. Die zu prüfenden Stoffe sollen einen raschen Wirkungseintritt aufweisen. Tritt nämlich die Wirkung erst längere Zeit nach der Injektion ein, so wird die Beurteilung unsicherer, da ein gewisser Prozentsatz der Tiere sich auch ohne medikamentöse Beeinflussung nach einiger Zeit im Zitterkäfig beruhigt. Dieser Forderung entsprechen die von uns untersuchten

Substanzen; sie kommen, intraperitoneal verabreicht, schon nach durchschnittlich 5—10 min zur Wirkung. — 2. Die Tiere sollen nach dem zum Zwecke der Injektion erfolgten Herausnehmen aus dem Zitterkäfig die gleiche Motilität zeigen wie während der viertelstündigen Kontrollperiode. Zur Prüfung dieser Frage injizierten wir 50 Tiere mit 0,01 ml/g 0,9%ige Kochsalzlösung. 3 der so erhaltenen 50 Kurven täuschten eine sedative Wirkung vor. Dieser Fehler von 6% fällt im Hinblick auf die pro Substanz verwendete Tierzahl nicht ins Gewicht.

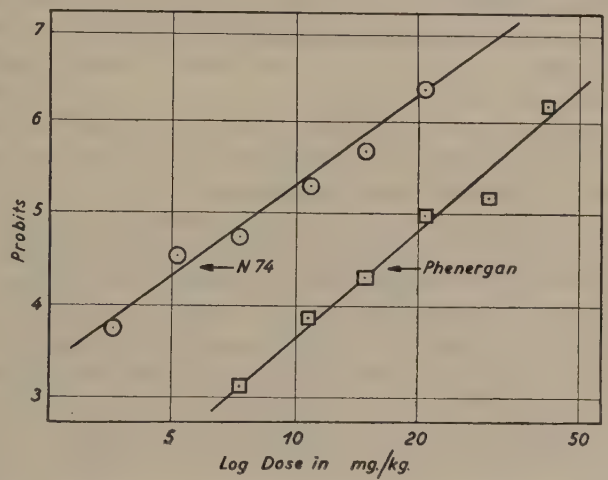


Abb. 1. Regressionslinien der sedativen Wirkung von Phenergan und N 74.

Phenergan	*N 74*
$Y = -0{,}2389 + 3{,}8554\,x$	$Y = 2{,}0228 + 3{,}3074\,x$
$b = 3{,}86 \pm 0{,}95$	$b = 3{,}31 \pm 0{,}83$
$\chi^2_{[4]} = 1{,}00$	$\chi^2_{[4]} = 1{,}47$
$SD_{50} = 23{,}4$ (18,2—30,1)* mg/kg	$SD_{50} = 8{,}0$ (6,0—10,6) mg/kg

* Zahlen in Klammern = 95% Fiduzialgrenzen.

Resultate und Diskussion.

Die mittlere sedative Dosis wurde für Phenergan (N-Dimethylamino-2-propyl-1-thiodiphenylamin) mit 23,4 mg/kg, für N 74 (Bis[p, p'-butylmercapto]-benzhydryl-β-diaethylaminoäthylsulfid)* mit 8,0 mg/kg bestimmt (vgl. Abb. 1). Die SD_{50} von Benadryl (β-Dimethylaminoäthylbenzhydrylätherchlorhydrat) kann nicht bestimmt werden. Sie dürfte für diese Substanz etwa bei 25 mg/kg liegen. In diesem Dosenbereich wird aber die sedative Wirkung bereits durch die erregende Komponente der Verbindung verdeckt, reagiert doch bei 30,0 bzw. 42,0 mg/kg keines der Versuchstiere mehr mit Beruhigung. Für drei weitere untersuchte Antihistaminica (Histaphen, Neo-Antergan, Pyribenzamin) konnte die SD_{50}

* Die Substanz wurde — wie andere Vertreter der gleichen chemischen Gruppe — bei uns durch Ing. P. V. Petersen dargestellt.

aus den gleichen Gründen nicht bestimmt werden. Die drei Stoffe sind deshalb nicht besonders aufgeführt worden. Für sie wird also die Beobachtung Winters (1948) bestätigt, wonach die erregende Komponente für die Maskierung des sedativen Effekts bei Tieren verantwortlich zu machen ist. Phenergan hingegen ist einer direkten Bestimmung der sedativen Wirkung zugänglich.

Zur Erfassung sedativer Wirkungen im Tierversuch in Form registrierbarer Änderungen der Spontanbewegungen sind relativ hohe Dosen erforderlich. Der Grund dafür liegt wohl nicht in erster Linie in einer unterschiedlichen Empfindlichkeit des tierischen im Vergleich zum menschlichen Organismus gegenüber zentral depressiven Pharmaka, sondern scheint eher eine Folge der groben Beurteilungsmethode zu sein. Die systematische Applikation hoher Dosen führt nicht selten zum Auftreten von mit der Hauptwirkung interferierenden Nebenwirkungen. Dies ist tatsächlich für verschiedene Antihistaminica der Fall, wenn wir — mit Rücksicht auf unsere Problemstellung — die sedative Wirkung der Verbindungen als Hauptwirkung, die erregende als Nebenwirkung betrachten. Daraus aber schließen zu wollen, daß Antihistaminkörper nur beim Menschen, nicht aber beim Tier sedativ wirken (Feinberg 1950; Leonard und Huttrer 1950), ist nicht gerechtfertigt und wird zum Teil durch die vorliegenden Untersuchungen direkt widerlegt.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung sedativer Wirkungen im Tierversuch beschrieben. — Die Bewegung von Mäusen wird vor und nach intraperitonealer Injektion der zu prüfenden Substanzen kymographisch registriert, und der Prozentsatz der bei den gewählten Dosen „positiv" reagierenden Tiere bestimmt. Durch Anwendung von Probit- und Log. Dosis-Transformation wird eine Gerade erhalten, aus welcher der Wert für 50% Sedation interpoliert werden kann. — Die mittlere sedative Dosis (SD_{50}) wurde für Phenergan mit 23,4 mg/kg bestimmt.

Literatur.

Abbozzo, G., E. Genazzani et L. Donatelli: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 209 (1951). — Feinberg, S. M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **50**, 1186 (1950). — Finney, D. J.: Probit Analysis. London: Cambridge University Press 1947. — Leonard, F., and C. P. Huttrer: Histamine Antagonists. Washington D. C.: National Research Council 1950. — Macht, D. I., and T. Hoffmaster: Fed. Proc. **7**, 242 (1948). — Schlagintweit, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **131**, 212 (1928). — Winter, C. A.: J. of Pharmacol. **94**, 7 (1948). — Winter, C. A., and L. Flataker: Fed. Proc. **8**, 169 (1949). — J. of Pharmacol. **101**, 156 (1951).

Dr. H. Weidmann, Kopenhagen-Valby, H. Lundbeck & Co. A.-G.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 501—506 (1952).

Aus dem Pathologischen Institut der Akademie für medizinische Forschung und Fortbildung der Justus-Liebig-Hochschule Gießen
(Direktor: Prof. Dr. med. Gg. Herzog).

Untersuchungen über den „Vitamin T-Komplex Goetsch" mit Hilfe der Gewebezüchtung*.

Von
W. Knoth.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Januar 1952.)

Die bisherigen tierexperimentellen (Goetsch) und klinischen (Nussbaumer, Glanzmann, Schmidt u. a.) Beobachtungen lassen im „Vitamin T-Komplex Goetsch" einen Wirkstoff besonderer Prägung vermuten. Durch die mikrobiologische und papierchromatologische Aufschlüsselung des Vitamin T-Gesamtkomplexes (Weygand und Wacker) in Vitamin B_{12}, Desoxyriboside, Leuconostoc citrovorum Faktor, Lactobacillus bulgaricus Faktor und Folinsäure ist den Untersuchungen über die Wirkungsweise des sogenannten Supervitamins eine wissenschaftliche Grundlage gegeben.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden angeregt durch die Wundheilungsexperimente Barons. Er vermutete, daß der günstige Heilungseffekt durch „Vitamin T-Komplex Goetsch" auf einer „Stimulierung der Bindegewebszellen" beruht.

Material und Methodik.

Unsere Untersuchungen führten wir an Meerschweinchenmilzkulturen aus, die mit der Deckglasmethode gezüchtet wurden. Das Umsetzen der Kulturen erfolgte in der Regel alle 2—3 Tage, wobei wir die Kulturen stets vollständig ohne Umschneidung zur nächsthöheren Passage weiterbrachten.

Bekanntlich wandern nach Börner und Gg. Herzog bei der explantierten Meerschweinchenmilz zuerst schon nach etwa 1—2 Std sehr reichlich Lymphocyten aus. Nach 16—20 Std folgen große, pseudopodial verzweigte Zellen vom Typ der Makrophagen, die meist bis zum 3. und 4. Tag in zweiter „Passage" vorherrschend sind. Etwa am 3. Tag sieht man länglich-spießige Zellen in zusammenhängenden Verbänden dem Muttergewebe entwachsen, die am 5. bzw. 6. Tag in dritter „Passage" schon einen meßbaren, gleichmäßig radiären Wachstumshof bilden. Diese Zellen werden allgemein als Fibroplasten bezeichnet. Daß es sich hierbei auch vielfach um mitgewucherte Endothelsprossen der Milzsinus handelt, konnte Gg. Herzog nach Untersuchungen an Serienschnitten des explantierten Milzgewebes zeigen. Nach Untergang der Lymphocyten und Makrophagen hat man nach der

* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

dritten „Passage" eine Fibroplastenreinkultur, cum grano salis, vor sich. Das Mitwuchern von Endothelsprossen ist bei den vorliegenden Versuchen nicht unerwünscht, bietet doch der Wundheilungsvorgang ähnliche Verhältnisse. Gerade „das Gesamtverhalten der Milzkulturen, daß trotz des Lebens in vitro Prinzipien erhalten bleiben, bis zu einem gewissen Grade analog denen, die wir vom Studium des Körpers her kennen" (Börner), ließ uns die Wahl der Meerschweinchenmilz als Versuchsobjekt besonders geeignet erscheinen.

Nach den Beobachtungen an sogenannten Normalkulturen (Explantation von Milzgewebe in homologem Plasma und Hühnerembryonalextrakt) setzten wir den Kulturen auch „Vitamin-T-Komplex Goetsch" in steigenden Verdünnungen — mit Ringer-Lösung — zu. Wir gingen dabei so vor, daß neben Kulturen in Plasma und Embryonalextrakt solche in Plasma und „Vitamin-T-Komplex Goetsch" und wieder andere als Kontrollkulturen in Plasma und Ringer-Lösung gezüchtet wurden. Die Konzentration des Hühnerembryonalextraktes wurde bei der Bereitung des Nährmediums für die sogenannten Normalkulturen stets 20%ig gehalten, nachdem wir uns am Anfang unserer Versuche davon überzeugt hatten, daß, wie auch A. Fischer schreibt, erst eine Verdünnung des Embryonalextraktes mit Ringer-Lösung 1:5 optimales Wachstum zuläßt. Innerhalb einer Züchtungsperiode kamen gleichviele Kulturen in zwei getrennten Versuchsserien zur Bearbeitung, wobei wir in jeder Serie unter gleichen Bedingungen eigene Versuchs- und Kontrollkulturen an- bzw. umsetzten. Bei insgesamt 1997 Einzelkulturen werteten wir sowohl die Emigration der Makrophagen als auch das Wachstum der Fibroplasten aus. Die Wanderung der Lymphocyten konnte meßtechnisch nicht exakt erfaßt werden. Die Emigrations- bzw. Wachstumsareale wurden jeweils 24 und 48 Std nach den Ansetz- bzw. Umsetztagen gemessen und kurvenmäßig dargestellt.

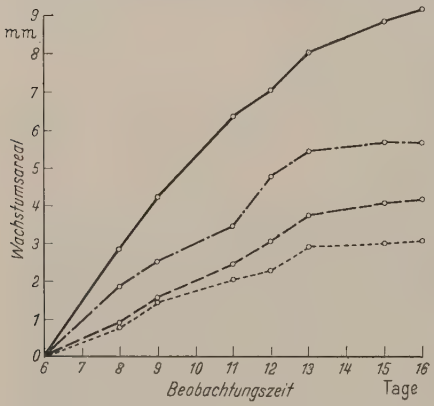


Abb. 1. Wachstumskurven von Fibroplastenkulturen gezüchtet in homologem Plasma + Embryonalextrakt ————, in homologem Plasma + Ringer-Lösung ·····, in homologem Plasma + T-Vitamin 1:500000 — · — · —, in homologem Plasma in T-Vitamin 1:1 Million ------.

Ergebnisse.

Unsere Versuche umfaßten „Vitamin T-Komplex Goetsch"*-Konzentrationen von 1:20 bis 1:1 Million. Es zeigte sich, daß alle Kulturen, angesetzt mit „Vitamin T-Komplex Goetsch" 1:20 und solche mit „Vitamin T-Komplex Goetsch" 1:50, in Emigration und Wachstum völlig gehemmt waren. Erst bei stärkeren Verdünnungen wie 1:100, 1:1000, 1:10000 konnten Wanderung der Makrophagen und Wachstum der Fibroplasten beobachtet werden. Die Fibroplasten wuchsen um so weiter und dichter aus, je schwächer wir die „Vitamin T-Komplex

* Versuchsmengen von „Vitamin-T-Komplex Goetsch" wurden von der Pharmazell G.m.b.H. Raubling/Oberbayern zur Verfügung gestellt.

Goetsch"-Konzentration wählten. Hinzugefügt sei, daß Konzentrationen von 1:100 bis 1:100000 am Anfang das Wachstum der Fibroplasten stets verzögerten, durch nachfolgende Beschleunigung wurden jedoch die Verzögerungen wieder aufgeholt und die Kontrollkulturen übertroffen.

In Abb. 1 ist das Wachstum der Fibroplasten kurvenmäßig dargestellt. Die in homologem Plasma und Embryonalextrakt gezüchteten

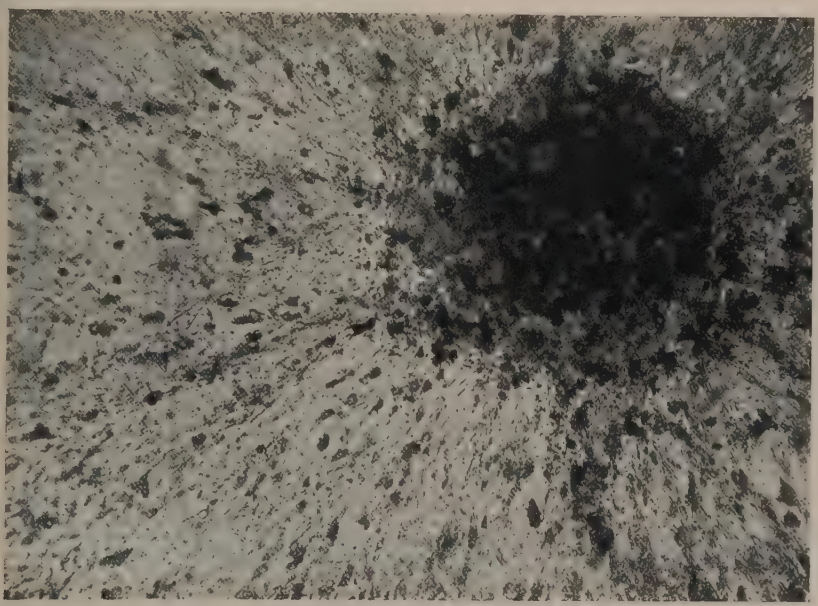


Abb. 2. 18 Tage alte Fibroplastenkultur, 6. Passage; in homologem Plasma + Embryonalextrakt. Photo: Vergrößerung 56fach.

Milzkulturen zeigten zu jeder Beobachtungszeit die größte Wachstumsausdehnung. Die Kurve der in Plasma und „Vitamin T-Komplex Goetsch" bei Konzentrationen von 1:500000 und 1:1 Million gewachsenen Kulturen folgen den sogenannten Normalkulturen am besten. Mit den kleinsten Wachstumsarealen setzt sich die Kontrollkurve der in Plasma und Ringer-Lösung gezüchteten Kulturen deutlich ab. Weiter geht aus der graphischen Darstellung hervor, daß mit „Vitamin T-Komplex Goetsch"-Konzentrationen von 1:500000 besseres Wachstum erzielt werden kann als mit „Vitamin T-Komplex Goetsch"-Konzentrationen von 1:1 Million.

Neben den unterschiedlichen Ergebnissen bei den Wachstumszonenmessungen ließen die Versuchs- und Kontrollkulturen auch rein morphologisch ein anderes Verhalten erkennen. Die in Plasma und Embryonalextrakt gezüchteten sogenannten Normalkulturen zeigten stets ein

gleichmäßiges, allseitiges Wachstum der Fibroplasten, wobei die Zellen meist in dichten Formationen, etwa in gleich weiter Entfernung vom Mutterstück aus, in das Medium vordrangen (siehe Abb. 2). Im schroffen Gegensatz dazu verhielten sich die als Kontrollkulturen geführten Plasma und Ringer-Kulturen. Abgesehen von der geringen Wachstumsgeschwindigkeit und Ausdehnungsgröße waren hier die Wachstumshöfe vielfach sehr unregelmäßig begrenzt, die Zellverbände aufgelockert, wie in Un-

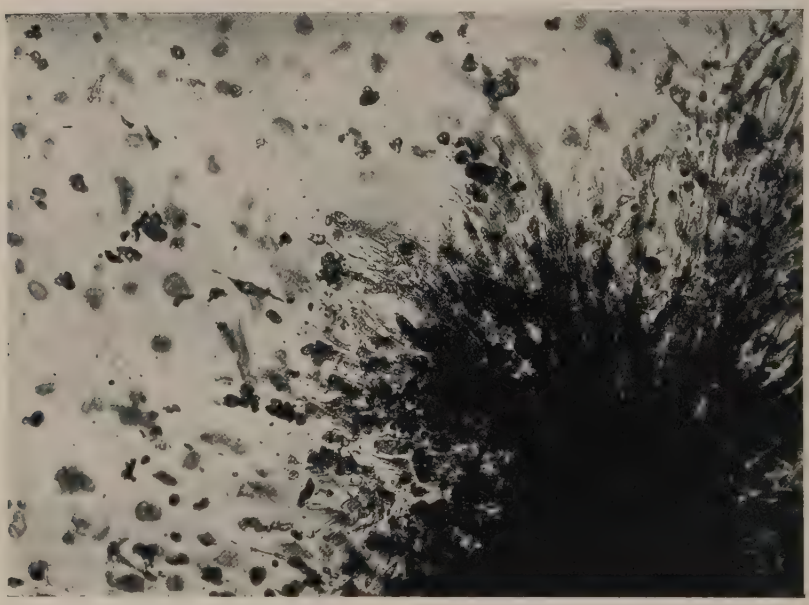


Abb. 3. 18 Tage alte Fibroplastenkultur, 6. Passage; in homologem Plasma + Ringer-Lösung. Photo: Vergrößerung 56fach.

ordnung geraten und viele Zellen in der peripheren Zone völlig abgelöst und abgerundet. Dazu kamen noch starke regressive Zellverfettungen in den Plasma-Ringer-Kulturen (siehe Abb. 3). Anders dagegen das Bild der Plasma- und „Vitamin T-Komplex Goetsch"-Kulturen, wenn wirksame Konzentrationen zur Anwendung kamen (siehe Abb. 4). Das annähernd gleichartige Aussehen wie die sogenannten Normalkulturen ist augenfällig. Ein Vergleich mit den in Plasma und Ringer-Lösung gezüchteten Kontrollkulturen beweist die wachstumsanregende Wirkung des „Vitamin T-Komplex Goetsch".

Die Frage nach der wirkungsvollsten „Vitamin T-Komplex Goetsch"-Konzentration in bezug auf das Wachstum der Fibroplasten können wir dahingehend beantworten, daß mit Konzentrationen um 1:500000 die optimale Wirkung erreicht wird. Über den Wirkungsmechanismus geben

unsere Versuche keinen Aufschluß. Ob es sich dabei um ein Eingreifen in die zelluläre Eiweißsynthese handelt (Pototschnig), kann noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Bedeutungsvoll scheint uns aber die Tatsache, daß im sogenannten „Vitamin T-Goetsch" ein komplexer Wirkstoff vorliegt, dessen Einzelkomponenten sich zum Teil gegenseitig in ihrer Aktivität unterstützen bei gleichzeitiger Mitführung hochwertiger Aminosäuren (Grunhofer und Schöberl).

Abb. 4. 18 Tage alte Fibroplastenkultur, 6. Passage; in homologem Plasma + T-Vitamin 1:500000. Photo: Vergrößerung 56fach.

Zusammenfassung.

Zur Prüfung des wachstumsanregenden Effektes von „Vitamin T-Komplex Goetsch" auf mesenchymale Zellen werden 1997 Einzelkulturen mit „Vitamin T-Komplex"-Konzentrationen von 1:20 bis 1:1 Million behandelt.

Dabei ergab sich für Konzentrationen von 1:20 bis 1:50 eine absolut emigrations- und wachstumshemmende Wirkung für Makrophagen und Fibroplasten. Konzentrationen von 1:100 bis 1:100000 regten das Wachstum der Fibroplasten nach anfänglich geringgradiger Verzögerung deutlich an. Das Wirkungsoptimum lag bei 1:500000. Die Wachstumsanregung erreichte jedoch nicht diejenige von Embryonalextrakt.

An dieser Stelle möchte ich Frau E. Lapp für die wertvolle Mitarbeit im Gewebezüchtungslabor meinen Dank aussprechen.

Literatur.

Baron, H.: Ärztl. Forschg. **4/I**, 596 (1950). — Berger, H.-H.: Mschr. Kinderheilk. **98**, 433 (1950). — Börner, R.: Arch. exper. Zellforschg **12**, 125 (1932). — Börner, R., u. Gg. Herzog: Zbl. Path. **44**, 137 (1928/29). — Bühl, H.: Münch. med. Wschr. **27/28**, 1130 (1950). — Fischer, A.: Gewebezüchtung, Handbuch der Biologie der Gewebezellen in vitro. München 1930. — Glanzmann, E.: Helvet. Paed. Acta **5**, 401 (1950). — Goetsch, W.: Österr. Zoolog. Z. **1**, 49 (1946). — Grunhofer, H., u. A. Schöberl: Klin. Wschr. **29**, 385 (1951). — Herzog, Gg.: Verh. dtsch. path. Ges., 26. Tg. 1931. — Nussbaumer, G.: Wien. med. Wschr. **101**, 369 (1951). — Pototschnig, H.: Med. Klinik **46**, 987 (1951). — Schmidt, G.-W.: Arch. Kinderheilk. **142**, 113 (1951). — Weygand, F., u. A. Wacker: Angew. Chemie **62**, 454 (1950).

Dr. W. Knoth, Gießen,
Pathologisches Institut der Akademie für medizinische Forschung und Fortbildung.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 507—512 (1952).

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik in Wien
(Vorstand: Prof. Dr. K. Fellinger).

Die Nierentubuli im Intravitalmikroskop.

Von
O. Frank und V. Lachnit.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. November 1951.)

Mikroskopische Untersuchungen an der lebenden Niere wurden erstmals 1924 von Richards und Schmidt[1] im auffallenden Licht an der Froschniere ausgeführt. Einen wesentlichen Fortschritt in der Intravitalmikroskopie brachte die von Ellinger und Hirt[2] angegebene Methode der *Intravitalmikroskopie im Luminescenzlicht*, die auch zur Untersuchung der Säugetierniere geeignet ist.

Der Vorteil dieser Methode liegt zunächst darin, daß das untersuchte Organ durch Bestrahlung mit unsichtbarem ultravioletten Licht zum Selbstleuchter wird und die bei der Auflichtmikroskopie im sichtbaren Licht störenden Reflexe an der feuchten Organoberfläche dadurch wegfallen. Außerdem sind die Fluorochrome noch in sehr starker Verdünnung (bis 1 : 100000 und mehr) nachweisbar und stören, falls sie den später zu erörternden Anforderungen entsprechen, sicherlich nicht die Organfunktion, wie dies bei Verwendung konzentrierter Farbstoffe oder sogar von Tusche doch in gewissem Maße der Fall sein kann.

Unsere *Methodik* entsprach der von Ellinger und Hirt[2] angegebenen. Wir verwendeten ein Florescenzmikroskop der Firma C. Reichert* mit der von Fellinger und Schmid[3] angegebenen Lichtquelle. Die Auflichteinrichtung (Opakilluminator der Firma C. Reichert) wurde an einem Mikroskopstativ mit beweglichem Objekttisch angebracht. Da mit Wasserimmersion beobachtet wurde, schlossen wir an das Immersionsobjektiv mittels einer Glascapillare eine Spülung an, wodurch die Frontlinse während der ganzen Untersuchung mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung bespült wurde. Die Versuchstiere, in unserem Fall weiße Mäuse, wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 0,1 cm^3 einer 20% Urethanlösung pro 20 g Tier narkotisiert und auf einer mit einem Abfluß versehenen Tasse mit Korkeinlage und etwas erhöhtem Drahteinsatz in überdrehter Rechtsseitenlage befestigt. Zur Freilegung der Niere führten wir einen seitlichen Längsschnitt vom Rippenbogen etwa 1 cm nach abwärts. Nach Durchtrennung des Peritoneums war bei richtiger Lage des Hautschnittes die Niere bereits sichtbar. Sie wurde

* Für die leihweise Überlassung des Mikroskopstativs und der Immersionsobjektive möchten wir an dieser Stelle der Fa. C. Reichert unseren Dank aussprechen.

vorsichtig herausgewälzt und die Haut ober- und unterhalb des Nierenstieles durch zwei vorher gelegte Fäden verschlossen. Zur Ruhigstellung und Ausschaltung der störenden Atembewegungen lagerten wir das Organ nun auf ein geeignetes Tischchen, das mittels eines Stativs am Rand der Tasse befestigt, durch ein Kugelgelenk in allen Richtungen des Raumes beweglich und durch eine feine Schraube in der Höhe verstellbar war. Die Operation führte zu keiner nennenswerten Blutung, erforderte jedoch größte Sorgfalt, da schon geringste Quetschungen der Niere zu Störungen ihrer Funktion führten. Nach Einführung einer Injektionsnadel in die Schwanzvene wurde die Niere zunächst ohne Farbstoffapplikation im Mikroskop beobachtet. Dann erst erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle die Injektion des Farbstoffes. Ein heizbarer Objekttisch stand uns leider nicht zur Verfügung. Wir mußten uns darauf beschränken, den Arbeitsraum möglichst warm zu halten und dauernd auf die entsprechende Temperatur der Spülflüssigkeit zu achten. Da die Nierenoberfläche nicht ideal glatt ist, sind starke Immersionsobjektive nicht von Vorteil. Wir verwendeten ein Objektiv 1:30 und wählten zur Erzielung einer stärkeren Vergrößerung ein stärkeres Okular (10 mal). Mit der geschilderten Methodik konnte die Niere viele Stunden lang ohne Schädigung der Versuchstiere beobachtet werden.

Von der großen Anzahl bekannter Fluorescenzfarbstoffe sind für intravitalmikroskopische Untersuchungen bei weitem nicht alle geeignet. Die Beobachtung der Nierenfunktion verlangt eine weitere Einschränkung der Zahl geeigneter Fluorochrome. Diese müssen in erster Linie ungiftig sein, eine Forderung, die bei den verwendeten niedrigen Konzentrationen relativ leicht zu erfüllen ist. Ferner darf nach Aufnahme des Farbstoffes durch die Zellen die folgende Bestrahlung mit UV-Licht nicht zu einer Störung der Zellfunktion führen, wie dies z. B. bei Verwendung der Farbstoffe Thioflavin S und Berberinsulfat von Singer[4] als „photodynamischer Effekt" beschrieben wurde. Übrigens kann auch Fluorescein, allerdings erst nach stundenlanger Bestrahlung, zu einer örtlichen, reversiblen Lichtschädigung Anlaß geben (Hirt[5]). Für die Beobachtung der Nierenfunktion kommen vor allem rasch und leicht ausscheidbare Farbstoffe in Frage.

Das Zustandekommen einer Vitalfärbung wird nach Keller[6] durch die physikochemischen Eigenschaften des verwendeten Farbstoffes einerseits und des untersuchten Gewebes andererseits bestimmt. Bezüglich des Farbstoffes ist neben der Teilchengröße, die bei Nierenuntersuchungen auch für die Ausscheidbarkeit eine Rolle spielt, vor allem die elektrische Ladung des Farbstoffes von Bedeutung, indem Gewebe mit positivem Potential negativ geladene Farbstoffteilchen an sich reißen und umgekehrt. Die elektrische Ladung der Farbstoffteilchen ist nun keine fixe Größe, sondern wechselt mit dem Milieu. So ist z. B. der zu intravitalmikroskopischen Untersuchungen am meisten verwendete Farbstoff Fluorescein in destilliertem Wasser negativ geladen, während er bei einem Überschuß positiv geladener Plasmakolloide, von denen er adsorbiert wird, im elektrischen Feld zur Kathode wandert, sich also positiv verhält (Keller[6], Starkenstein und Weden[7]). Dies tritt aber nur dann ein, wenn die Farbstoffkonzentration so niedrig ist, daß wirklich ein Überschuß von Plasmakolloiden vorhanden ist. Ist dies nicht der Fall, so verhalten sich die Farbstoffmoleküle, die nicht adsorbiert werden können, wie in destilliertem Wasser, nämlich elektronegativ. Es ist also auch bei konstantem

Milieu die elektrische Ladung der Farbstoffteilchen Schwankungen unterworfen, die durch die Konzentration bedingt sind. Auch eine Veränderung der Dispersität der Farbstoffe kann zu einer Änderung ihrer Ladung führen. Dies kann auch durch das Altern der Farbstofflösungen eintreten (KELLER[8]), weshalb nur frische Lösungen verwendet werden dürfen.

Bezüglich des Gewebes ist die mechanische Struktur von Bedeutung, wodurch auch die Verschiedenheit der Färbung bei verschiedener Applikationsart zu erklären ist. In erster Linie jedoch wird auch hier die Färbbarkeit durch das elektrische Potential bestimmt.

Elektrohistologische Untersuchungen KELLERS[9] mittels Mikroelektroden haben eine starke Elektronegativität der Tubulusepithelien der Niere mit einzelnen positiven Granula im Plasma und positivem Zellkern ergeben, weshalb für die Vitalfärbung der Tubulusepithelien Farbstoffe geeignet sind, die in biologischem Milieu positiv geladen sind. Da gewisse Farbstoffe von Plasmakolloiden, die praktisch in allen Körperflüssigkeiten, wenn mitunter auch nur in Spuren, vorhanden sind, adsorbiert werden, ist es nötig, streng zwischen einer Polarität im biologischen Milieu und der in destilliertem Wasser zu unterscheiden. Dies trifft auch für alle von uns verwendeten Farbstoffe zu (HAITINGER und GEISER[10]). Die exakte Polaritätsbestimmung wird im FÜRTHschen Hochspannungsapparat vorgenommen. Wir bedienten uns der wesentlich einfacheren, aber absolut brauchbaren Methode des *Filterpapierversuches* (KELLER[11]): Taucht man ein Filterpapier in eine Farbstofflösung, so steigt bei Negativität des Farbstoffes das Wasser rascher auf als der Farbstoff; positive Farbstoffe steigen gleich schnell auf. Die Ursache dieses Verhaltens liegt in der niedrigen Dielektrizitätskonstante des Filterpapiers, das sich bei Berührung mit dem Wasser (hohe Dielektrizitätskonstante) negativ auflädt. Feste Beziehungen zwischen Reaktion der Farbstoffe und Färbbarkeit bestehen nicht.

Wir haben nun das Verhalten und die Ausscheidung verschiedener Farbstoffe in der normalen Niere im Intravitalmikroskop beobachtet. Da die verwendeten Farbstoffe alle fein dispers sind, erfolgte die Ausscheidung prompt, ihre Dauer war von der Menge des injizierten Farbstoffes abhängig. Es wurden in zahlreichen Versuchen optimale Applikationsart, Menge und Konzentration des Farbstoffes bestimmt. Im Gegensatz zu anderen Untersuchern bevorzugten wir die intravenöse Injektion, da dabei die Farbstoffausscheidung plötzlich einsetzte und die zeitlichen Verhältnisse besser zu überblicken waren als bei subcutaner Anwendung, bei der Resorption und damit auch Ausscheidung mehr allmählich vor sich gingen. Die Menge des Farbstoffes wurde so gewählt, daß die Ausscheidung nicht zu lange dauerte und in längstens 5 Std beendet war. Auf die Bedeutung der Konzentration wurde oben hingewiesen.

Die Untersuchung der Mäuseniere erlaubt die Beobachtung der Tubuli contorti I. Ordnung und einzelner Tubuli contorti II. Ordnung. Die Glomeruli und die Mehrzahl der Tubuli contorti II. Ordnung liegen tiefer und sind nicht zu sehen, können jedoch an der Rattenniere durch eine besondere Methode (ELLINGER[12]) sichtbar gemacht werden. Unsere Untersuchungen erstreckten sich in erster Linie auf die Tubuli contorti I. Ordnung, die ohne Farbstoffinjektion in homogener bläulicher Eigenfluorescenz

zu sehen sind, Tubuli contorti II. Ordnung werden erst nach der Farbstoffinjektion sichtbar.

Am eindrucksvollsten war die Ausscheidung von *Primulin*, einem gelben Thiazolfarbstoff, der in einer Konzentration von 1:2000 in physiologischer Kochsalzlösung im Filterpapierversuch negative, nach Serumzusatz positive Ladung zeigte. Sofort nach Injektion von 0,2 cm^3 der Farbstofflösung wurde das ganze Gesichtsfeld hell und wie von einem Schleier überzogen (Farbstoff im Blut). 1 sec später zeigte sich eine strahlend blaue Lumenfärbung, während das Epithel nach wie vor Eigenfluorescenz erkennen ließ. Dazwischen waren inselförmig Tubuli contorti I. Ordnung ohne Farbstoffausscheidung zu sehen, wohl inaktiven Glomeruli zugehörend. Etwa 30 sec später trat auch eine intensive hellblaue Epithelfärbung auf. 3 min nach der Injektion hatte die Lumenfärbung bereits deutlich abgenommen, die Epithelfärbung war intensiver geworden und zeigte unregelmäßig angeordnete hell leuchtende Pünktchen, was von uns als Granulafärbung bezeichnet wurde. Außerdem waren Lumenfärbung und wesentlich schwächere Epithelfärbung in den Tubuli contorti II. Ordnung zu erkennen, die sich durch eine mehr weißlichblaue intensivere Färbung von den Tubuli contorti I. Ordnung unterschieden. 15 min nach der Farbstoffinjektion war in den Lumina der Tubuli contorti I. Ordnung kein Farbstoff mehr zu sehen, das Epithel jedoch noch deutlich gefärbt. Nach 2 Std sind die Tubuli contorti I. Ordnung auch im Epithel farbstofffrei geworden, während die Tubuli contorti II. Ordnung im Lumen und angedeutet auch im Epithel noch deutliche Fluorescenz zeigten. Nach 3 Std war die Ausscheidung praktisch beendet. Abb. 1 zeigt in einer Tubulusgruppe noch intensive Fluorescenz, während die umgebenden Tubuli contorti I. Ordnung nur noch wenig Farbstoff enthalten. Die Granulafärbung ist nur als Inhomogenität der Färbung zu erkennen, da die Aufnahme infolge der erforderlichen langen Belichtungszeit (15 min) nicht ideal scharf ist.

Die Ausscheidung der Farbstoffe *Fluorescein-Natrium*, *Thiazinrot* und *Kongorot* in einer Konzentration von 1 : 1000 erfolgte im Prinzip in gleicher Weise. Granulafärbung war nur bei Verwendung von Fluorescein-Natrium zu sehen. Die Ausscheidung von Kongorot setzte erst nach einer gewissen Latenz ein. Dieser Farbstoff zeigte auch im Filterpapierversuch insofern ein etwas anderes Verhalten, als er in einer Konzentration von 1 : 1000 mit und ohne Serumzusatz gleich schnell wie das Wasser aufstieg, einer positiven Ladung des Farbstoffes entsprechend. Erst bei Prüfung einer Konzentration von 1 : 10000 zeigte sich dasselbe Verhalten wie bei den übrigen verwendeten Farbstoffen. Dies ist wohl dadurch zu erklären, daß die Dispersität des Kongorots wesentlich geringer ist als die der übrigen geprüften Farbstoffe. Die Ansicht Picks[13], daß in normalem Licht rot erscheinende Farbstoffe für intravitalmikroskopische Untersuchungen im Luminescenzlicht nicht geeignet seien, können wir nicht teilen.

Primulin erscheint uns insofern am besten geeignet, als die Ausscheidung am raschesten vor sich geht und am leichtesten zu überblicken

ist. Eine störende Überstrahlung, wie sie z. B. bei Fluorescein vorkommt, ist bei Verwendung von Primulin nicht zu befürchten.

In allen Versuchen konnte eindeutig festgestellt werden, daß die Farbstoffe vom Lumen in das Epithel rückresorbiert werden. Eine Sekretion eines Farbstoffes durch die Tubulusepithelien konnte nie beobachtet werden. Die erzielte Vitalfärbung entsprach den eingangs erörterten Gesetzen. Eine toxische Wirkung war bei keinem Farbstoff feststellbar. Für die bei Verwendung von Fluorescein und Primulin beobachtete körnige Epithelfärbung gebrauchten wir den Ausdruck Granulafärbung, da wir

Abb. 1.

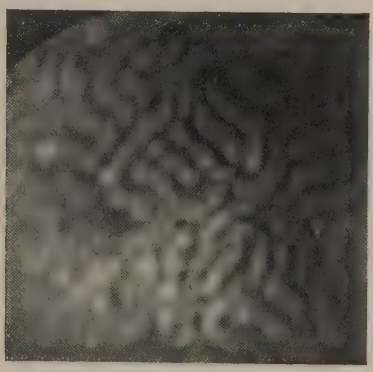


Abb. 2.

Abb. 1. Primulinausscheidung durch die normale Mäuseniere. Granulafärbung in einer Tubulusgruppe.

Abb. 2. Primulinausscheidung durch die Mäuseniere nach Injektion von 0,18 cm³ einer 5%igen Novuritlösung pro 20 g Tier. Ausbleiben einer Epithelfärbung.

sie mit den Vitalgranula, die v. Möllendorff[14] bei Verwendung mancher Farbstoffe beobachtete, für identisch halten. Der Autor erklärte ihre Entstehung durch Vakuolen, in denen der Farbstoff durch Konzentrierung ausflockt. Eine im Plasma präformierte Anlage dieser Vitalgranula lehnt v. Möllendorff ab. Einen Zusammenhang mit den von Keller[6] gefundenen elektropositiven Granula im negativen Plasma halten wir nicht für wahrscheinlich, da in diesem Falle eine Anfärbung mit einem elektropositiven Farbstoff nicht möglich wäre. Dagegen konnten wir eine Beziehung dieser Granula zur normalen Zellfunktion beobachten, da nach traumatischen Nierenschädigungen, wie sie manchmal bei der Operation vorkamen, eine Granulafärbung nie zu erzielen war.

Als letztes untersuchten wir die Wirkung von *Novurit* in verschiedener Dosierung auf die Ausscheidung von Primulin. Bezüglich der Dosierung des Novurit stützten wir uns auf die Untersuchungen von Bonsmann und Müller-Neff[15], die an Mäusen die diuretische und toxische Novuritdosis ermittelten, wobei sie bei der toxischen Dosis zwischen Primärtod (sofort nach der Injektion) und Sekundärtod (nach einigen Tagen) unterschieden.

Auf Injektion von 0,09 cm³ einer 5%-Novuritlösung pro 20 g Tier (diuretische Dosis nach Bonsmann und Müller-Neff) 1½ Std vor der Beobachtung verlief die Farbstoffausscheidung deutlich beschleunigt. Es war das Durchschießen des Farbstoffes durch die Tubuli deutlich zu sehen, wobei die Passage einer Tubulusschlinge von mittlerer Länge etwa 1 sec dauerte. Die Granulafärbung im Epithel trat in völlig normaler Weise auf, war jedoch nach 40 min wieder verschwunden, während sie an der normalen Niere etwa 1½ Std zu beobachten war.

Bei Verwendung einer Dosis von 0,18 cm³ der 5%-Novuritlösung pro 20 g Tier (zwischen diuretischer und sekundär toxischer Dosis nach Bonsmann und Müller-Neff) zeigte sich wohl eine Farbstoffausscheidung im Lumen mit andeutungsweiser Epithelfärbung, aber keine Anreicherung des Farbstoffes im Epithel und keine Granulafärbung. Ein Teil der Versuchstiere starb am 2.—3. Tag. Abb. 2 zeigt wohl Farbstoff im Lumen, aber keine deutliche Epithelfärbung. Dieser Befund ist sicher nicht durch eine Hemmung der Rückresorption des Farbstoffes zu erklären, sondern ist infolge des Ausbleibens der Granulafärbung wohl Ausdruck einer Schädigung des Tubulusepithels, die Dosis also bereits als toxisch zu betrachten.

Die Methode der Intravitalmikroskopie im Luminescenzlicht erscheint somit zum Studium der Farbstoffausscheidung durch die Niere sehr geeignet. Bei genügender Erfahrung werden Untersuchungen mit dieser Methode auch in klinischer Fragestellung manchen Aufschluß geben können.

Zusammenfassung.

Es wurde auf eine Methode der direkten mikroskopischen Beobachtung der lebenden Niere hingewiesen. Die Untersuchung kann mit jedem lichtstarken Fluorescenzmikroskop und einigen Zusatzeinrichtungen ausgeführt werden. Die Bedingungen für das Zustandekommen und die Art einer Vitalfärbung wurden erörtert und die Ausscheidung von 4 Farbstoffen und ihr Verhalten in den Nierentubuli studiert. Schließlich wurde die Wirkung von diuretischen und toxischen Novuritdosen auf die Farbstoffausscheidung gezeigt.

Literatur.

[1] Richards, A. N., and C. F. Schmidt: Amer. J. Physiol. **71**, 178 (1924). — [2] Ellinger, Ph., u. A. Hirt: Z. Anat. **90**, 791 (1929). — [3] Fellinger, K., u. J. Schmid: Z. Mikrosk. **3**, 314 (1948). — [4] Singer, E.: Arch. of Path. **22**, 813 (1936). — [5] Hirt, A.: Zeiss-Nachrichten. 2. Folge, Heft 10, 358, 1939. — [6] Keller, R.: Erg. Physiol. **30**, 294 (1930). — [7] Starkenstein, E., u. H. Weden: Biochem. Z. **234**, 205 (1931). — [8] Keller, R.: Erg. Anat. **28**, 423 (1929). — [9] Keller, R.: Elektrizität in der Zelle. Wien 1918. — [10] Haitinger, M., u. P. Geiser: Virchows Arch. **312**, 116 (1944). — [11] Keller, R.: Z. physik. Chem. **98**, 338 (1921). — [12] Ellinger, Ph.: J. of Physiol. **97**, 433 (1940). — [13] Pick, J.: Z. Mikrosk. **51**, 338 (1934). — [14] v. Möllendorff, W.: Erg. Physiol. **18**, 141 (1920). — [15] Bonsmann, M. R., u. M. Müller-Neff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 77 (1935).

Dr. O. Frank, II. Medizinische Universitätsklinik, Wien IX, Garnisongasse 13.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 513—517 (1952).

Aus der Medizinischen und Nervenklinik d. Städt. Krankenanstalten Wuppertal-Barmen (Chefarzt: Prof. Dr. A. Sturm).

Thiosemicarbazone und Gewebsatmung, zugleich ein Beitrag zum Abbau des Conteben.

Von

Hans Rohkrämer und Wilfried Wernitz.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Juli 1951.)

Im Rahmen unserer Untersuchungen über den quantitativen Nachweis und den Abbau des Conteben in Körperflüssigkeiten (Wernitz und Quecke; Wernitz, Rohkrämer und Tornus) gelangten wir zu dem Ergebnis, daß die Zerstörung des Conteben im Organismus hauptsächlich im intermediären Stoffwechsel erfolgen muß. Zur Klärung der Frage über den Ort der Zerstörung bedienten wir uns folgenden Verfahrens:

Von der Leber, Milz, Niere, Lunge und dem Gehirn gesunder Meerschweinchen wurden dünne Schnitte, die der „Grenzschnittdicke" nach Warburg entsprachen, hergestellt; in die Manometergefäße der Warburg-Apparatur wurden davon jeweils 20—30 Schnitte gebracht. Als Suspensionsflüssigkeit wurde eine mit Natriumbicarbonat gepufferte Ringer-Lösung ($p_H = 7{,}4$) verwandt, der gelöstes Conteben zugesetzt wurde. Die Contebenkonzentration betrug 5 mg%. Die Atmung der Gewebe erfolgte in reinem Sauerstoff bei 37° im Thermostaten bei einer Versuchsdauer von 2—3 Std. Durch vergleichende Untersuchungen von Contebenkonzentrationen vor Beginn und nach Beendigung der Atmungsversuche mit Hilfe der bereits a. a. O. beschriebenen Kupfer- und Diazotierungsmethoden war die Möglichkeit gegeben, über die Fähigkeit einzelner Organe zum Contebenabbau etwas auszusagen.

Es zeigte sich, daß atmendes *Leber- und Nierengewebe Conteben abzubauen vermag.* Der Unterschied der Anfangs- und Endkonzentrationen bei Leber- und Milzgewebe (Tab. 1) kann mit Sicherheit als ein Beweis für den Abbau gelten, da dieser Unterschied über den methodischen Fehler von 0,1 mg beträchtlich hinausgeht. Dagegen waren die Anfangs- und Endkonzentrationen bei Lungen-, Milz- und Gehirnschnitten unverändert. Schnitte von nichtatmendem, vorher im Eisschrank aufbewahrtem Leber- und Nierengewebe waren ebenfalls wirkungslos.

Bei den für derartige Versuche relativ wenig empfindlichen quantitativen Bestimmungsmethoden waren wir auf eine große Zahl von

Tabelle 1.

Organ	Konzentration in mg % Diazo-Methode	Konzentration in mg % Cu-Methode	Abgebaut in mg %	Bemerkung
Leber	4,1	3,7	0,4	
	4,4	3,7	0,7	
	4,7	4,0	0,7	
	4,6	3,8	0,8	
	4,8	4,1	0,7	
	4,6	4,0	0,6	
	4,6	4,5	0,1	
	4,4	4,4	0,0	nichtatmendes Lebergewebe
	4,0	3,9	0,1	
	4,0	3,9	0,1	
Niere	4,3	3,8	0,5	
	4,5	4,0	0,5	
	4,8	4,3	0,5	
	4,4	4,1	0,3	
	4,8	4,3	0,5	
	4,6	4,5	0,1	
	4,5	4,4	0,1	nichtatmendes Nierengewebe
	4,0	3,9	0,1	
	4,0	4,0	0,0	
Milz	4,6	4,5	0,1	
	4,5	4,5	0,0	
Herz	4,4	4,4	0,0	
	4,5	4,5	0,0	
Lunge	4,5	4,5	0,0	
Gehirn	4,5	4,5	0,0	
	4,4	4,4	0,0	

Gewebsschnitten angewiesen, um eindeutige Ergebnisse zu erzielen. Der entsprechend hohe Sauerstoffverbrauch bei einer Atmungsdauer von 2—3 Std gestattete uns bei unserer Versuchsanordnung und Apparatur keine gleichzeitige exakte Messung der Zellatmung. Da uns jedoch weiterhin interessierte, ob durch Contebenkonzentrationen von 5 mg%, wie wir sie in unseren obigen Versuchen verwandten, Änderungen der Zellatmung und damit der Zellfunktion nachweisbar sind, führten wir Paralleluntersuchungen durch.

Wir untersuchten die *Wirkung von Conteben auf die Atmung von Lebergewebe* gesunder ausgewachsener weißer Mäuse, deren durchschnittliches Gewicht 15—20 g betrug. Als Suspensionsflüssigkeit verwandten wir 2,7 cm³ Ringer-Lösung mit m/10 Phosphatpuffer nach Sörensen ($p_H = 7{,}4$). Im Einsatz der Manometergefäße (Volumina 15 cm³) befand sich 0,3 cm³ NaOH 10% zur Absorption der entstandenen Kohlensäure, in der Ansatzbirne 0,3 cm³ in Wasser gelöstes Conteben

in variierter Konzentration. Die Atmung erfolgte in reinem Sauerstoff bei 37°. Das Conteben wurde nach 60 min Versuchsdauer eingekippt.

Die Normalkurve (Abb. 1) setzt sich aus 30 Einzelversuchen zusammen und ergibt nach den ersten 15 min Werte für die Grundatmung (QO^2 nach WARBURG) von 9,05, unter Zusatz von Glucose zur Suspensionsflüssigkeit 10,45. Das sind Werte, die mit den in der Literatur angegebenen gut übereinstimmen. Die Atmungskurven mit Contebenzusatz setzen sich für jede Konzentration aus jeweils 12—16 Einzelversuchen zusammen, wobei hierfür immer mehrere Mäuse Verwendung

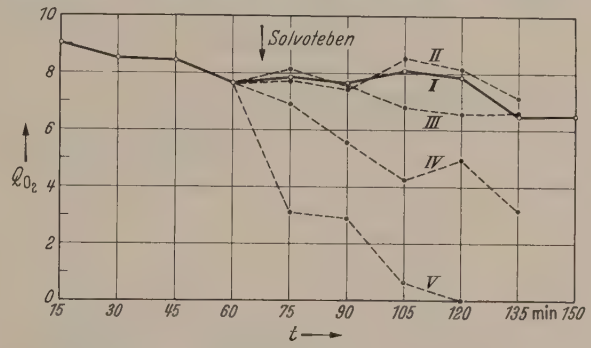


Abb. 1. Leber. I Normalkurve, II Zusatz von Tb I/698 : 1 mg%, III Zusatz von Tb I/698 : 0,1 mg%, IV Zusatz von Butadiol, V Zusatz von Antipyrin.
Die in der Zeichnung fälschlich eingetragene Bezeichnung Solvoteben muß Conteben heißen.

fanden. Wie sich aus der Abb. 1 leicht ersehen läßt, erfolgt bei Konzentrationen von 0,1 mg% und 1 mg% keinerlei verwertbare Abweichung von der Kurve der Grundatmung. Die Prüfung höherer Konzentrationen scheiterte an der Wasserunlöslichkeit von Conteben. Die Löslichkeitsvermittler des Conteben, wie Butadiol und 50% Antipyrin, verursachten allein bereits eine starke Atmungshemmung (Abb. 1), so daß eine Prüfung höherer Contebenkonzentrationen nicht durchführbar war.

Bei den gleichen Konzentrationen von 1 mg% und 0,1 mg% *Solvoteben* hat WIESENER eine Atmungssteigerung (bei 1 mg% bis zu 60%) gefunden, von Konzentrationen ab 10 mg% zunehmend deutliche Hemmung. Wir gingen daher der Frage nach, ob sich Conteben und Solvoteben tatsächlich in den Konzentrationsbereichen von 0,1 und 1 mg% in ihrem Einfluß auf die Zellfunktion unterscheiden. Aus der Abb. 2 ergibt sich, daß der Zusatz von Solvoteben bei Konzentrationen von 0,1 und 1 mg% unter unseren Bedingungen die Atmung des Lebergewebes weder im Sinne einer Steigerung noch einer Hemmung beeinflußt. Somit verhalten sich *Conteben* und *Solvoteben* bei Konzentrationen von 0,1 und 1 mg% *nicht unterschiedlich*. Bei 10 mg% erschien uns eine Beeinflussung im Sinne einer Hemmung möglich, bei 100 und 1000 mg% sehr wahrscheinlich (Abb. 2). Die Errechnung der mittleren Abweichung (σ), des

mittleren Fehlers des Mittelwertes (ε) und der signifikanten Differenz (k) der Atmungswerte der Normalatmung im Vergleich zur Atmung unter Solvoteben bei 120 min ergab folgende Werte:

für die Normalwertung: $\sigma = \pm 1{,}672$; $\varepsilon = 0{,}395$.
für 10 mg%: $\sigma = \pm 0{,}89$; $\varepsilon = 0{,}37$; $k = 2{,}21$.
für 100 mg%: $\sigma = \pm 0{,}274$; $\varepsilon = 0{,}122$; $k = 7{,}38$.
für 1000 mg%: $\sigma = \pm 2{,}76$; $\varepsilon = 0{,}873$; $k = 5{,}8$.

Außerdem wurde mit derselben Versuchsanordnung die *Atmung von Milzschnitten* weißer Mäuse untersucht (Abb. 3). Die Grundatmung der

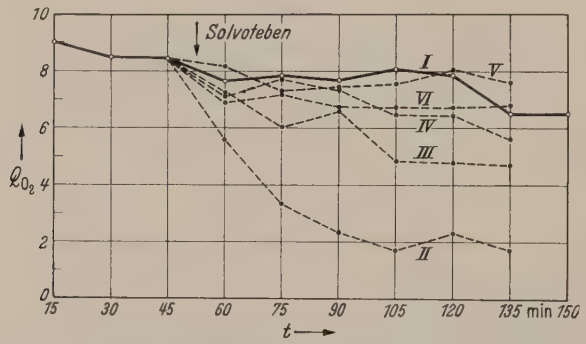


Abb. 2. Leber. I Normalkurve, II Zusatz von Tb VI: 10^{+4} γ/cm³ = 1000 mg%; III Zusatz von Tb VI: 10^{+3} γ/cm³ = 100 mg%; IV Zusatz von Tb VI: 10^{+2} γ/cm³ = 10 mg%; V Zusatz von Tb VI: 10^{+1} γ/cm³ = 1 mg%; VI Zusatz von Tb VI: 1 γ/cm³ = 0,1 mg%.

ersten 15 min (Q_{O_2} nach Warburg) betrug 11,4. Die Normalkurve zeigt von Viertelstunde zu Viertelstunde gemessen einen langsamen, stetigen Abfall, wobei der Abfall in der 1. Std etwas rascher als in der 2. Std erfolgt. Auf die Zugabe von *Solvoteben* in Konzentrationen, die bei der Leber deutliche Hemmung hervorriefen, erfolgte lediglich bei einer Konzentration von 1000 mg% eine Hemmung. Die Berechnung ergab bei 120 min für die Normalatmung $\sigma = \pm 0{,}466$, $\varepsilon = 0{,}208$, für die Konzentration von 1000 mg% $\sigma = \pm 0{,}283$, $\varepsilon = 0{,}142$, $k = 17{,}43$. Der Vergleich prozentualer Hemmung von Leber- und Milzatmung bei dieser Konzentration ergibt, daß die Leberatmung zu 70,5% und die Milzatmung zu 55,5% gehemmt wird. Schon bei 100 mg% blieb die Milzatmung im Gegensatz zur Leberatmung unbeeinflußt.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, daß die hemmende Wirkung der Thiosemicarbazone auf die Atmungsfunktion isolierter Leberzellen erst in Konzentrationen erfolgt, die bei der heute üblichen Dosierung in der Klinik niemals erreicht werden dürften. Doch ist es immerhin interessant, daß der *Stoffwechsel des Lebergewebes empfindlicher als der der Milz reagiert.* Es ist bekannt, daß das *Thiosemicarbacid* im Tierversuch weit toxischer ist als die Benzaldehydthiosemicarbazone. So erklärt sich

vielleicht die größere Hemmung der Leberzellatmung dadurch, daß bei der Zerstörung des Conteben und Solvoteben reines Thiosemicarbacid abgespalten wird. Die relative Unwirksamkeit der niedrigen therapeutischen Contebendosen, bezogen auf die Zellatmung der Leber, findet ihre Parallele in der früher von uns geäußerten Ansicht (Sturm, Rohkrämer und Kaumanns), daß die *Thiosemicarbazone im allgemeinen für die Leber ungefährlich* sind. Dabei sind wir uns bewußt, daß zu weitgehende

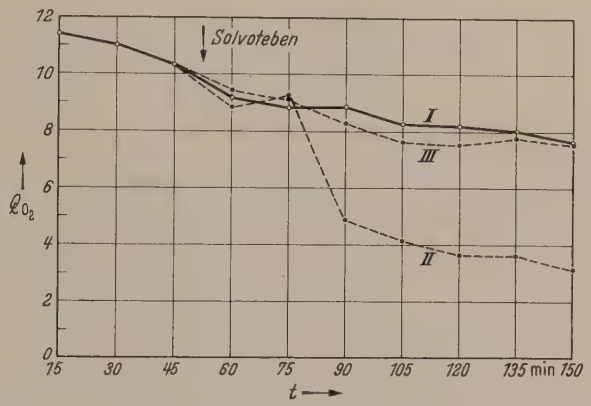


Abb. 3. Milz. I Normalkurve. — II Zusatz von Tb VI: 10^{+4} γ/cm³ = 1000 mg%; III Zusatz von Tb VI: 10^{+3} γ/cm³ = 100 mg%.

Schlüsse aus Untersuchungen isolierter lebender Zellen für die Klinik nicht gezogen werden dürfen.

Zusammenfassung.

1. An lebenden Organschnitten von Meerschweinchen konnte gezeigt werden, daß der Abbau von Conteben in der Leber und in der Niere erfolgt.

2. In Atmungsversuchen in der Warburg-Apparatur konnte eine Atmungshemmung von Leber- und Milzgewebe weißer Mäuse nur bei Konzentrationen von Solvoteben nachgewiesen werden, die in der heutigen therapeutischen Dosierung nicht erreicht werden dürften. Die Leberatmung reagierte empfindlicher als die Milzatmung. Es ist möglich, daß dies auf der Einwirkung der abgespaltenen *Thiosemicarbacidgruppe* in den abbauenden Organen beruht.

Literatur.

Sturm, A., H. Rohkrämer u. H. Kaumanns: Dtsch. med. Wschr. **1950**, 1335. — Wernitz, W., u. Quecke: Z. klin. Med. **149**, 94 (1952). — Wernitz, W., Rohkrämer u. Tornus: Z. klin. Med. (im Druck). — Wiesener, H.: Mschr. Kinderheilk. **1950**, 353.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 518—522 (1952).

Aus der Medizinischen und Nervenklinik d. Städt. Krankenanstalten Wuppertal-Barmen (Chefarzt: Prof. Dr. A. Sturm).

Thiosemicarbazone und Hyaluronidase.

Von

H. Rohkrämer und W. Wernitz.

Mit 1 Textabbildung.

(*Eingegangen am 12. Juli 1951.*)

Neben dem tuberkulostatischen Wirkungsmechanismus ist in letzter Zeit auch mehrfach über einen *antirheumatischen Effekt der Thiosemicarbazonderivate* berichtet worden (Heilmeyer, Buchegger, Kuhlmann). Es wurden dabei auch zahlreiche cortisonähnliche Effekte dieser Medikamente beobachtet (Eosinophilensturz, Gewebsminderung des Thymus, Cushing-Syndrom, Glycosurie, Zunahme des Nebennierenrindengewichts, Acne vulgaris, Senkungsverminderung), die den Angriffspunkt der Thiosemicarbazone am Hypophysen-Nebennierenrindensystem wahrscheinlich machten. Eine endgültige und einheitliche Deutung aller Phänomene ist nach Heilmeyer jedoch vorerst nicht möglich.

Die augenblickliche Diskussion über die Bedeutung des Hyaluronsäure-Hyaluronidase-Systems für den Gelenkrheumatismus, die Hemmwirkung stark antirheumatischer Mittel (Natr. salicyl., Cortison, ACTH) auf die Hyaluronidase haben uns im Rahmen unserer Contebenuntersuchungen zur *Prüfung* veranlaßt, *ob dem beschriebenen antirheumatischen Effekt der Thiosemicarbazonderivate Wirkungen auf das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System zugrunde liegen.* Die Untersuchung direkter Beziehungen zwischen Thiosemicarbazonen und Hyaluronidase erschien uns weiterhin interessant, da man in jüngster Zeit die diffusionsverbessernden Wirkungen von Hyaluronidase durch Inhalation zur Erreichung eines größtmöglichen tuberkulostatischen Effektes der Thiosemicarbazonderivate auszunutzen versucht (Ehlert).

Nach den bisher vorliegenden experimentellen Grundlagen ist keine unbedingte Parallelität der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Fermentaktivität zu erwarten. Es finden sich zum Teil ganz erhebliche Diskrepanzen zwischen den in vitro- und in vivo-Testverfahren, wobei man bei den biologischen mit wesentlich größeren Unsicherheitsfaktoren rechnen muß (entzündliches Ödem, Druck, Injektionsvolumen usw.). Als in vitro-Test benutzten wir den Viscositätsminderungstest, in Ergänzung hierzu als einfachste biologische Methode den Spreading-Test.

I. Viscositätsminderungstest.

Es wird hierbei die Zeit bestimmt, die nötig ist, damit Hyaluronidase eine bestimmte Veränderung der Viscosität der Hyaluronsäure (gemessen an der Auslauf-Geschwindigkeit) bewirkt. Diese Zeit ist ein Maß für die Aktivität des Ferments.

Als Viscosimeter diente uns eine capillarausgezogene, schräg geschliffene Pipette mit 2 Meßmarken, die von einem Flüssigkeitsmantel konstanter Temperatur (30°) umgeben war. Die Auslaufgläser befanden sich ebenfalls in einem temperaturkonstanten Wasserbad.

Ferment: Hyaluronidase (Kinetin-Schering).

Substrat: Hyaluronsäure (gewonnen aus Nabelschnüren), 200—400fach verdünnt mit 6% NaCl-Lösung, mit 10 Vol% einer Acetatpufferlösung versetzt und filtriert. Der Puffer wurde stets frisch hergestellt aus n-NaOH, die mit Eisessig für die Contebenuntersuchungen auf ein p_H von 4,5, für die Untersuchungen mit Solvoteben auf ein p_H von 6,4 gebracht wurde, da nur bei diesem p_H das Solvoteben in Lösung bleibt. Stets wurden vorher die Auslaufzeiten der Vergleichslösung nach 5minütigem Temperieren, der Substratlösung nach 5 und 30 min bestimmt. Für die zu prüfende Fermentlösung wurde die Abnahme der Viscosität, gemessen an der Verminderung der Auslaufzeit bestimmt; danach erfolgten die Zusätze der Thiosemicarbazone. Es wurden zur Sicherung der Ergebnisse immer Doppel- und Dreifachbestimmungen durchgeführt.

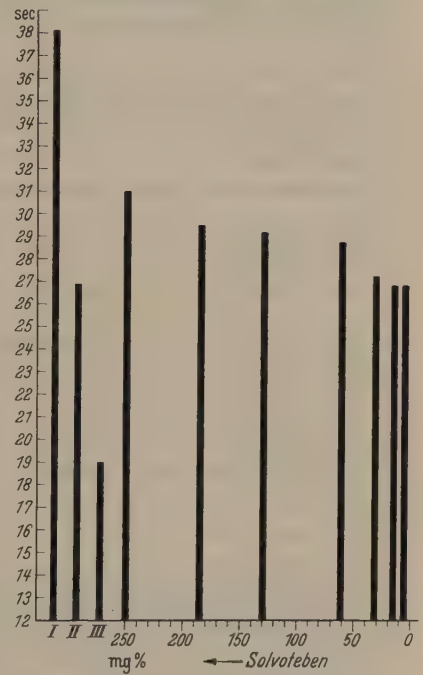


Abb. 1. Auslaufzeit für I Hyaluronsäure 38,1 sec; II n. Einwirken von Hyaluronidase 26,9 sec; III Vergleichslösung (6% NaCl-Lösung und 10 Vol.%-Puff.) 19,0 sec. Hyalurodinase plus Solvoteben: 250 mg% 31,0 sec; 187 mg% 29,5 sec; 125 mg% 29,2; 62 mg% 28,8 sec; 31 mg% 27,3 sec; 15,6 mg mg% 26,9; 7,8 mg% 26,9 sec.

Die Untersuchung mit *Contebenzusätzen* ergab, daß Endkonzentrationen bis zu 4 mg% *weder einen hemmenden noch aktivierenden Einfluß* auf die Aktivität der Hyaluronidase hatten. Die Unlöslichkeit des Conteben verhinderte eine Prüfung höherer Konzentrationen. Die Prüfung des *Solvoteben* (ausgehend von einer 1%igen selbst hergestellten Lösung) ergab jedoch *von einer Konzentration von 31 mg% an aufsteigend eine zunehmende Aktivitätshemmung der Hyaluronidase*, während niedrigere Konzentrationen ebenfalls ohne Einfluß waren (Abb. 1).

II. Spreading-Test.

Es werden gesunden Versuchspersonen Trypanblau-enthaltende Lösungen jeweils mit und ohne Hyaluronidase- und Thiosemicarbazon-

zusätzen (0,1 cm^3 pro inj.) intradermal injiziert, in bestimmten Zeitabständen je 2 Durchmesser der verschiedenen Farbflecke (D und d) gemessen und die Ausrechnung nach der Formel $\frac{D \cdot d}{4}$ durchgeführt, wobei das hierbei gefundene rechnerische Produkt ein relatives Maß für die Fläche der Farbausbreitung darstellt. Die Befunde mit *Solvoteben* gehen aus folgender Tabelle hervor:

Zeit der Ablesung nach	1′	12,5′	25′	37,5′	3 Std	20 Std	
I Trypanblau 0,9% NaCl (2 Teile)	13,81	17,0	20,0	24,43	79,95	351,5	$\frac{D \cdot d}{4}$
II Trypanblau Kinetin 0,9% NaCl	17,5	29,75	36,75	86,06	237,5	525	
III Trypanblau Solvoteben 0,9% NaCl	13,12	15,7	17,81	21,25	42,0	78,75	
IV Trypanblau Solvoteben Kinetin	12,19	17,81	28,7	35,75	120,0	126	
Versuch	A					B	

Die Versuche A und B zeigen hinsichtlich der Ausbreitung, daß

1. *die Hyaluronidase die Diffusion ganz erheblich vermehrt,*
2. *die Fermentwirkung durch Solvoteben in Konzentrationen von 3,33g% und 3,3 mg% gehemmt wird,*
3. *Solvoteben allein bereits die Diffusion hemmt.*

Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, indem die Hyaluronidase jedoch nicht, wie bisher, mitinjiziert, sondern 15 min vor der intradermalen Injektion in die Oberarmhaut verrieben wurde. Dabei konnte wiederum festgestellt werden, daß Solvoteben bereits allein eine Diffusionshemmung verursacht. *Eine percutane Hyaluronidasewirkung wurde jedoch vermißt.* Die Ausbreitung auf den eingeriebenen *Hautstellen* war gegenüber den normalen Hautbezirken nicht verstärkt, eher leicht vermindert.

Der diffusionshemmende Einfluß von Solvoteben bereits bei 3,3 mg% veranlaßte uns, *Conteben* und das neue *Bioteben* in diesen Konzentrationen (3,3 mg% und 0,5 mg%) ebenfalls zu testen. Die Mittelwerte von 2 Versuchspersonen ergaben, daß diese Thiosemicarbazonderivate *allein keine hemmende Wirkung* aufwiesen. *Auch der fermenthemmende Einfluß wurde vermißt.*

Diskussion.

Die Versuche mittels des *Viscositätsminderungstestes* zeigen, daß in vitro eine direkte *Einwirkung* von Conteben und Solvoteben in Konzentrationen, wie sie im Organismus erreicht werden, *auf die Hyaluronidase nicht besteht.* Ob die für Solvoteben nachgewiesene Hemmung von 31mg% an aufwärts eine für dieses Thiosemicarbazonderivat allein zukommende Eigenschaft ist, läßt sich aus dem in vitro-Test allein nicht entscheiden, da Conteben infolge seiner Unlöslichkeit in diesem Konzentrationsbereich nicht prüfbar ist. Auffällig ist aber, sofern man Parallelen zwischen in vitro- und in vivo-Methoden ziehen darf, daß *Solvoteben im Spreading-Test einen deutlich hemmenden Einfluß* auf die Hyaluronidase (3,3 mg%) besitzt, der Conteben und Bioteben nicht zukommt. Die drei geprüften Thiosemicarbazonderivate unterscheiden sich durch ihre verschiedenen Parasubstituenten, so daß man daraus folgern muß, daß die bei Solvoteben wirksame *Hemmung nicht auf das Thiosemicarbacid zurückzuführen* ist.

Da es sich beim Solvoteben um das leicht lösliche Diäthanolaminsalz des p-Carboxybenzaldehydthiosemicarbazons handelt, könnte der Effekt durch das Di-Äthanolamin bedingt sein. Es ist bekannt, daß auch vor allem zahlreiche Phenole, abhängig von der Zahl der OH-Gruppen und der Länge der Seitenketten, Inhibitorwirkung aufweisen. Die deutliche Diffusionshemmung von Trypanblau durch Solvoteben bereits ohne Hyaluronidasezusatz unterstreicht die *Unspezifität des Vorgangs*, so daß der Hemmeffekt *wahrscheinlich* nichts anderes als einen *Entzündungshemmeffekt* darstellt. Sowohl intracutan injizierte Farbstoffe als auch die Hyaluronidase, die durch Quellung des Schwefelsäureesthers der Hyaluronsäure wirkt, rufen ein *entzündliches Begleitödem* hervor. So kam Heinlein zu dem Ergebnis, daß die *Entzündung* „das Ausmaß der durch die Hyaluronidase erzeugten *Diffusion* nicht nur nicht herabsetzt, sondern im Gegenteil *noch verstärkt*".

Für wichtig halten wir auch den völlig *negativen Ausfall percutaner Hyaluronidaseeinreibungen* auf die nachfolgende intracutane Farbstoffdiffusion. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von Vollmer überein, der bei seinen Tuberkulin-Pflasterproben mit und ohne Hyaluronidasezusatz keine Unterschiede bezüglich der Hautreaktion finden konnte. Er schließt daraus, daß die *Epidermis gar keine Hyaluronsäure* enthält. (Da dann der Wirkungsmechanismus der von Bresgen und Heinlein berichteten erfolgreichen percutanen Insulinapplikation schon theoretisch nicht mehr vorstellbar wäre, dürfte eine Nachprüfung wichtig sein.)

Zusammenfassung.

Es wurde geprüft, ob dem antirheumatischen Effekt der Thiosemicarbazonwirkungen auf das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System zugrunde liegen, wie dies von anderen stark antirheumatisch wirkenden Substanzen bekannt ist.

1. Im Viscositätsminderungs-Test zeigte lediglich Solvoteben eine Hemmung der Hyaluronidase in Konzentrationen, wie sie im Organismus nicht erreichbar sind (ab 31 mg%).

2. Im Spreading-Test fand sich nur nach Solvoteben (3,33 g% und 3,3 mg%) ein fermenthemmender Einfluß, nicht nach Bioteben und Conteben. Es handelt sich um eine unspezifische Inhibitorwirkung, wahrscheinlich im Sinne einer Entzündungshemmung, da auch ohne Hyaluronidase-Zusatz eine Diffusionsminderung von Farbstoffen nach Solvoteben eintritt.

3. Perkutane Hyaluronidaseeinreibungen blieben auf die nachfolgende intracutane Injektion von Farbstoffen ohne Effekt.

Literatur.

Bresgen u. Heinlein: Münch. med. Wschr. **1951**, Nr. 13, 657. — Buchegger: Münch. med. Wschr. **1951**, 741. — Calesnick u. Beutner: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 629 (1949). — Ehlert: Med. Klin. **1951**, 716. — Gibbian: Angew. Chemie **1951**, 105. — Guerra: J. of Pharmacol. **87**, 193 (1946). — Science (Lancaster, Pa.) **103**, 686 (1946). — Heilmeyer: Med. Welt **1951**, 141. — Klin. Wschr. **1950**, 254. — Verh. dtsch. Ges. inn. Med. Wiesbaden 1951. — Heinlein: Zbl. Path. **85**, 339 (1949). — Kuhlmann: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. Wiesbaden 1951. — Ragan and Meyer: Amer. J. Acad. Sci. **52**, 7 (1950). — Opsahl: Yale J. Biol. a. Med. **22**, 2 (1949); **21**, 487 (1949). — Seifter u. Fitch: Amer. J. Med. Sci. **1950**, Nr. 936. — Swyer: Biochemic. J. **42**, 32 u. 28 (1948). — Vollmer: Amer. J. Dis. Childr. **80**, 59 (1950).

Dr. Hans Rohkrämer, Wuppertal-Barmen, Med. und Nervenklinik d. Städt. Krankenanstalten.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 523—533 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg.

Über Wirkungen von Bienengift am Skeletmuskel des Frosches.

Von

HANS THILO HOFMANN.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Dezember 1951.)

Schlangengifte rufen am Froschmuskel Fibrillationen, Kontrakturen und Quellung hervor[1, 2], beeinträchtigen die elektrische Erregbarkeit[1–3] und sollen außerdem einen „curareartigen" Effekt besitzen[1–16].

Gewisse Analogien zwischen Schlangengiften und Bienengift, so das äußere Vergiftungsbild im Tierversuch, die gemeinsamen Effekte auf Blutdruck und isolierte Organe wie Darm[17] und Herz[2, 18] (übrige Literatur bei GESSNER[19] und FORSTER[20]), sowie gemeinsame Fermentwirkungen (Lecithinasewirkung[19, 21], Dehydrasenhemmung[22, 23]) veranlaßten uns zu prüfen, ob Bienengift ebenfalls Wirkungen auf die Skeletmuskulatur und die neuromuskuläre Übertragung besitzt.

Experimenteller Teil*.

1. Kontrakturwirkung des Bienengiftes.

Methodik: Die Versuche wurden vorwiegend an Temporarien beiderlei Geschlechts ausgeführt, wobei Tiere aller Jahreszeiten herangezogen wurden. Um dem unterschiedlichen Verhalten verschiedener Muskeltypen[24] Rechnung zu tragen, kamen jeweils M. sartorius, M. gastrocnemius und M. rectus abdominis zur Verwendung. Die isolierten Muskeln wurden am BETHE-KOPYLOFFschen Hebel[25] in sauerstoffdurchperlter Tyrodelösung suspendiert und die Aktionen isotonisch registriert. Die Belastung betrug beim Sartorius und Gastrocnemius je 10 g, beim Rectus 5 g; das Hebelverhältnis ist bei den Abbildungen jeweils angegeben.

Als Bienengiftpräparat diente ein über das Pikrat gereinigtes Trockengift, das uns die Firma Heinrich Mack Nachf., Illertissen, freundlichst überließ. Meist wurde von frischen Stammlösungen 1 : 1000 1 cm^3 in das 9 cm^3 Tyrodelösung enthaltende Muskelgefäß gegeben, so daß eine Endverdünnung von 1 : 10000 entstand; zur Prüfung geringerer Konzentrationen wurde von entsprechend höheren Verdünnungen ausgegangen.

Bienengift 1 : 10000 verursacht an allen untersuchten Muskeln Kontrakturen, bei denen man fast regelmäßig eine rasche Initialverkürzung von einer sich langsam ausbildenden Sekundärkontraktur unterscheiden kann (Abb. 1). Beim Sartorius geht sie innerhalb von etwa 20—40 min spontan völlig zurück, während sie beim Gastrocnemius größtenteils

* Zum Teil unter Mitarbeit von E. HÜLSTEDE (Diss. Würzburg 1951).

bestehen bleibt und beim Rectus meist langsam zur submaximalen bis maximalen Verkürzung ansteigt.

Die charakteristischen Bilder erhält man etwa bis zur Konzentration 1:100000. Eine Lösung 1:500000 verursacht noch deutliche Kontrakturen, läßt jedoch meist die Initialverkürzung vermissen, und die Verdünnung 1:1000000 wirkt am Gastrocnemius nicht mehr sichtbar, ruft am Sartorius nur eine schnell vorübergehende schwache Kontrakturneigung hervor, erzeugt aber am Rectus noch eine beträchtliche Ver-

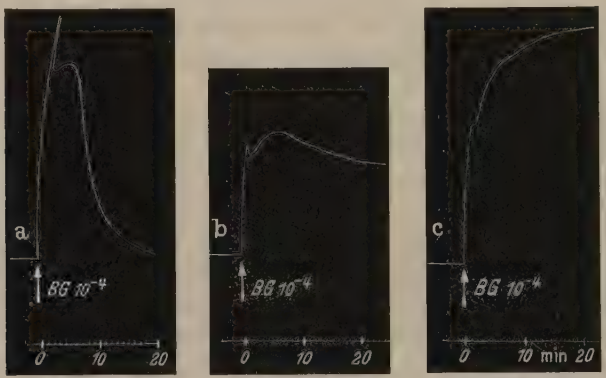


Abb. 1. R. temp., a = M. sartorius, b = M. gastrocnemius, c = M. rectus abdominis. Hebel 1:10. *BG* = Bienengift.

kürzung. Diese entwickelt sich zwar langsam, kann aber innerhalb einiger Stunden noch submaximale Werte erreichen. Somit kann man wohl den Rectus als den gegen Bienengift empfindlichsten Muskel bezeichnen.

Die Muskeln reagieren innerhalb ihrer individuellen Schwankungsbreite verschieden stark, die Kontraktur des Gastrocnemius scheint jedoch jeweils am geringsten zu sein. Besonders jahreszeitliche Schwankungen machen sich stark geltend. Während frischgefangene Frühjahrs- und Herbstfrösche etwa gleich stark ausgebildete Kontrakturen ergeben, zeigen die Muskeln von Sommerfröschen kaum stärkere Verkürzungen, und einige Monate in Gefangenschaft gehaltene Wintertiere reagieren ebenfalls nur mit geringeren Muskelverkürzungen, die jedoch die der Sommerfrösche im allgemeinen übertreffen. Muskeln von Rana esculenta reagieren meist nur schwach.

2. Reversibilität der Kontraktur, Einfluß kontrakturverhütender Mittel und anodischer Polarisation; Membranpotential im Verlauf der Verkürzung.

Ist die Kontraktur durch Bienengift 1:10000 einmal ausgebildet, so läßt sie sich durch Auswaschen nicht wieder aufheben, und auch eine Spülung mit giftfreier Tyrodelösung während des Entstehens der Kontraktur — etwa 3 min nach Giftzugabe — verändert beim Gastrocnemius den Verlauf nicht wesentlich. Dagegen scheinen die durch Grenzkonzen-

trationen (1:500000 bis 1:1000000) verursachten Verkürzungen wenigstens zum Teil reversibel zu sein.

Weiter war die Beeinflußbarkeit durch kontrakturverhütende Mittel von Interesse. Durch Atropinsulfat 1:1000 wird die Kontraktur am M. rectus weder unterdrückt noch aufgehoben, sondern anscheinend eher etwas verstärkt. Auch Novocain verhindert die Verkürzung beim Sartorius, Rectus (je 15 min Vorbehandlung mit 1% Novocain) und Gastrocnemius (1 Std Vorbehandlung mit 1% Novocain) nicht, schwächt sie aber zu etwa 30—50% ab. Anscheinend wird aber beim Gastrocnemius durch einstündige Novocainvorbehandlung die rasche Initialverkürzung aufgehoben, so daß sich die Kontraktur von vornherein langsam entwickelt.

Durch anodische Polarisation nach Fleckenstein, Hille und Adam[26] wird die Bienengiftkontraktur nicht aufgehoben. Die Anode beseitigt jeweils nur die auftretende Anodenöffnungskontraktur und läßt die durch Bienengift bedingte Verkürzung unbeeinflußt.

Der M. sartorius verlängert sich nach der Kontraktur, die von einem Potentialverlust begleitet ist, wieder, erlangt aber dabei sein ursprüngliches Membranpotential nicht zurück. Es nimmt sogar trotz Erschlaffung des Muskels noch weiter ab*. Diese Wiederverlängerung, der keine Regeneration des Membranpotentials parallel geht und die man beispielsweise auch nach längerem Aufenthalt des Sartorius in isotonischer KCl-Lösung findet, ist nicht dem normalen Erschlaffungsprozeß gleichzusetzen — dieser ist immer mit einer Repolarisation verknüpft —, sondern ist als Schädigung des kontraktilen Systems durch das kontrakturerzeugende Medium zu betrachten (Fleckenstein[27]).

3. Besonderheiten.

Fibrilläre und fasciculäre Zuckungen, wie sie teilweise unter Schlangengifteinwirkung[1, 2] auftreten, konnten wir unter Bienengift 1 : 10000 in normaler Tyrodelösung nur ausnahmsweise am M. gastrocnemius beobachten, doch stellten sie sich regelmäßig ein, wenn sich der Muskel vor und während der Gifteinwirkung in calciumfreier Lösung befand. Bienengift 1 : 1000 kann zuweilen auch in normaler Tyrodelösung schwache Fibrillationen hervorrufen. In calciumfreier Lösung werden die Bienengiftkontrakturen deutlich abgeschwächt und erreichen nur etwa die Hälfte der sonst üblichen Höhe. Kaliumfreie Lösung läßt dagegen keine Änderung des Kurvenverlaufs erkennen.

Setzt man einen Skeletmuskel ein zweites Mal einer Bienengiftkonzentration 1 : 10000 aus, so tritt diesmal kein Effekt mehr auf. Auch der Sartorius, der nach der ersten Kontraktur wieder erschlafft, zeigt dann keine Reaktion mehr. Nach Einwirkung schwächerer Verdünnungen löst gewöhnlich erst die um eine Zehnerpotenz stärkere Konzentration wieder eine deutliche Verkürzung aus.

---

* Orientierende Versuche hierzu verdanken wir dem freundlichen Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. K. E. Rothschuh, dem auch an dieser Stelle gedankt sei.

Nach einstündigem Erhitzen einer Bienengiftlösung 1 : 1000 auf 98° im Wasserbad lassen die daraus hergestellten Verdünnungen noch keine Veränderung ihrer Muskelwirksamkeit erkennen. Setzt man jedoch eine wesentlich schwächere Konzentration (1 : 100000) dieser Behandlung aus, so ist deren Muskeleffekt deutlich abgeschwächt. Die Kontraktur des Sartorius ist dann nur gering oder bleibt oft völlig aus. Höhere Konzentrationen sind also hinsichtlich ihrer Muskelwirkung relativ thermostabil, während geringere durch Erhitzen in ihrer Wirksamkeit abgeschwächt oder aufgehoben werden.

4. Beteiligung des Bindegewebes an der Kontraktur.

Der spontane Rückgang der Bienengiftkontraktur des Sartorius in der Giftlösung, der auch bei geringerer Belastung (5 g) eintritt, also keine

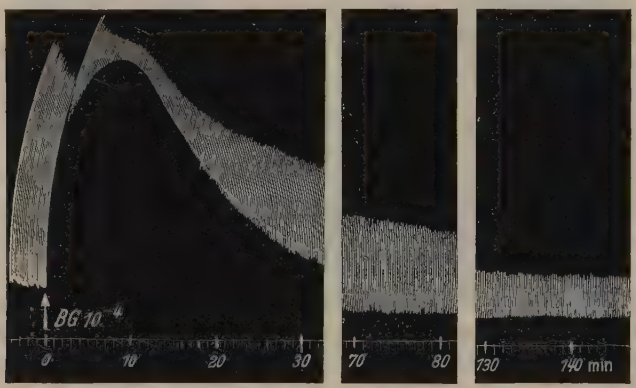


Abb. 2. R. temp., M. sartorius. Direkte Reizung. Hebel 1:5. *BG* = Bienengift.

Folge der für den grazilen Muskel relativ großen Belastung von 10 g ist, und die Dauerkontrakturen des Gastrocnemius und des Rectus stellten uns eine weitere Frage: Ist dieses unterschiedliche Verhalten allein eine Funktion des faserarchitektonischen Aufbaus der Muskeln, also des Verhältnisses von tonischen zu nichttonischen Fasern, oder kann dabei auch eine Beteiligung des Bindegewebes, das ja gerade beim Rectus stark ausgeprägt ist, vorliegen?

Verschiedene Autoren haben auf die Bedeutung des Bindegewebes bei Muskelkontrakturen hingewiesen, und in jüngster Zeit hat Rössel[28] seine Beteiligung an der Acetylcholinkontraktur des M. rectus sehr wahrscheinlich gemacht. Er konnte zeigen, daß nach Abziehen der Fascien des Rectus abdominis die Acetylcholinkontraktur dieses Muskels sich deutlich der des Sartorius nähert, d. h. schnell wieder zurückgeht.

Nach Abziehen der Rectusfascien gleicht sich in der Tat der Verlauf der Bienengiftkontraktur an diesem Muskel dem Verhalten am Sartorius an; innerhalb von 60 min geht die Verkürzung im kontrakturerzeugenden Medium spontan zurück. An der isolierten Fascie konnten wir jedoch keine Kontraktureffekte unter Bienengift erzielen.

5. Verhalten der elektrischen Erregbarkeit unter Bienengift.

Methodik: Die direkte Reizung erfolgte über den Bethe-Kopyloffschen Hebel mittels Kondensatorentladungen maximaler Reizstärke in einer Frequenz von 5/min. Zur indirekten Reizung wurde der N. ischiadicus über ein Paar Platinelektroden gelegt. Durch Umschalten am Reizgerät konnte der Muskel abwechselnd direkt und indirekt gereizt werden.

Die direkte Erregbarkeit der Muskeln läßt unter Bienengift bald nach und ist nach einiger Zeit vollkommen aufgehoben; hierbei sind wieder die charakteristischen Kontrakturen zu beobachten (Abb. 2—4). Auch dieser Vorgang ist bei einer Giftkonzentration 1:10000 irreversibel. Schwächere Konzentrationen beeinflussen die elektrische Erregbarkeit entsprechend langsamer.

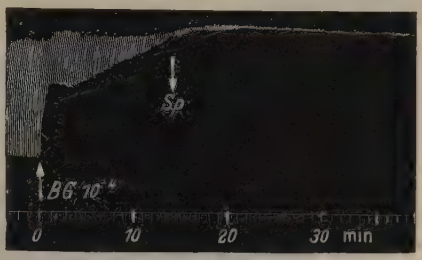


Abb. 3. R. temp., M. gastrocnemius. Direkte Reizung. Hebel 1:5. *BG* = Bienengift. *Sp* = Spülung.

Gastrocnemius und Rectus verlieren im allgemeinen ihre direkte Erregbarkeit rascher als der Sartorius; dieser kann nach der Vergiftung noch einige Stunden arbeiten, doch hatte oft auch er innerhalb von 120 min schon seine Erregbarkeit verloren.

Erhitztes Gift verhält sich ähnlich wie oben bei Besprechung der Kontrakturwirkung schon erwähnt.

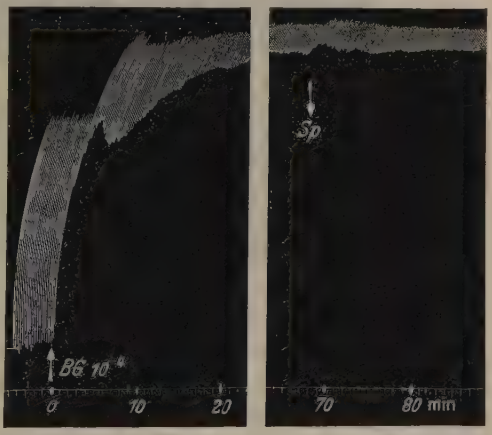


Abb. 4. R. temp., M. rectus abdominis. Direkte Reizung. Hebel 1:5. *BG* = Bienengift. *Sp* = Spülung.

Man muß auch bei dieser Bienengiftwirkung mit individuellen und jahreszeitlichen Schwankungen der Frösche rechnen. Die Kontraktion des Muskels der Abb. 2 erreichte beispielsweise nach 4 Std noch rund 9% der Ausgangshöhe, doch hatte ein unbehandelter Muskel in der gleichen Zeit erst etwa 25% seiner ursprünglichen Kontraktionshöhe eingebüßt. Andererseits scheinen Muskeln ausgehungerter Winterfrösche unter Bienengift besonders rasch ihre Erregbarkeit zu verlieren.

Bei abwechselnd direkter und indirekter Reizung des Gastrocnemius erlöschen bei einer Giftkonzentration von 1:10000 direkte und indirekte Erregbarkeit praktisch gleichzeitig im Maximum der Kontraktur. Auch bei Anwendung einer geringeren Konzentration (1:100000), die keine stärkere, das Bild verwischende Kontraktur verursacht, behalten innerhalb

von 60 min direkte und indirekte Zuckung annähernd gleiche Höhe (Abb. 5). Demnach besitzt Bienengift am Froschmuskel keine unter den geschilderten Versuchsbedingungen erfaßbare „curareartige" Wirkung.

Fleckenstein[29] beschrieb in anderem Zusammenhang am Nerv-Muskelpräparat des Frosches eine Aufhebung der Leitfähigkeit der Nervenfaser unter Bienengifteinwirkung. Dieser Block, der sich in einer Giftlösung 1 : 1000 nach über 1 Std einstellte, steht jedoch außerhalb unserer Fragestellung.

6. Vergleichsversuche mit Cobragift.

In der uns zugänglichen Literatur finden sich nur bei Schaumann[2] einige Kurven, die mit Najagiften am Gastrocnemius erhalten sind. Diese

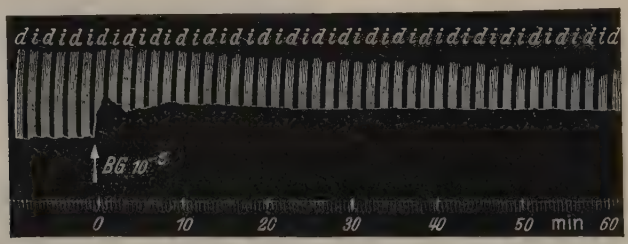


Abb. 5. R. temp., M. gastrocnemius. Nerv-Muskelpräparat. *d* = direkte, *i* = indirekte Reizung. Hebel 1:5. *BG* = Bienengift.

gestatten jedoch keinen ausreichenden Vergleich mit den von uns am Froschmuskel beobachteten Bienengiftwirkungen. Wir stellten daher mit dem Gift der indischen Cobra (Naja tripudians), das aus dem Handel bezogen wurde, selbst einige Versuche an. Es verursacht in Lösung 1:10000 an den von uns untersuchten Muskeln ebenfalls irreversible Kontrakturen, die den durch Bienengift hervorgerufenen teilweise ähneln (Abb. 6). So kann man am Sartorius eine rasche Anfangsverkürzung von einer sich langsamer ausbildenden sekundären Kontraktur unterscheiden, die sich auch spontan wieder löst. Von den untersuchten Muskeln zeigt der Gastrocnemius unter Cobragifteinwirkung ebenfalls die geringste Kontraktur, während die Kontraktur des Rectus unter sonst gleichen Bedingungen maximal wird. Bei den beiden letzten Muskeln fehlt aber anscheinend die unter Bienengift beobachtete Initialverkürzung. Fibrilläre Zuckungen, wie sie durch Cobragift 1:1000 hervorgerufen werden sollen[1], treten nach unseren Beobachtungen bei der Konzentration 1:10000 am Sartorius nicht immer auf und scheinen am Gastrocnemius und Rectus völlig zu fehlen.

Auch die Muskelkontraktionen werden durch Cobragift ähnlich beeinflußt wie durch Bienengift. Das Bild der Zuckungskurve des Sartorius ist dem unter Bienengifteinwirkung erhaltenen sehr ähnlich. Ebenso steht das Myogramm des Gastrocnemius bis auf die fehlende Initialverkürzung dem unter Bienengift beobachteten nahe, während sich der

Rectus anscheinend anders verhält; er geht ohne Anfangsverkürzung unter ständiger Abnahme der Kontraktionshöhen relativ schnell in maximale Verkürzung über. Diese Vorgänge sind bei Anwendung der Konzentration 1:10000 ebenfalls irreversibel.

Die Angaben über die „curareartige" Wirkung des Cobragiftes (Naja tripudians) am Nerv-Muskelpräparat des Frosches sind nicht einheitlich, was vielleicht durch die unterschiedliche Methodik bedingt ist. So fanden Kellaway und Holden[14], daß eine Giftkonzentration von 1 : 200000 nach 4½ Std den Nerven leitungsunfähig macht, Gautrelet und Halpern[9] sahen bei einer Konzentration von 1 : 10000 nach 30—50 min jede Erregbarkeit aufgehoben und Sarkar und Maitre[11] geben bei der gleichen Dosierung eine Blockierung nach 80 min an, während nach ihren Angaben die direkte Erregbarkeit erst nach 120 min erloschen ist. Nach Houssay u. Mitarb.[1] sowie

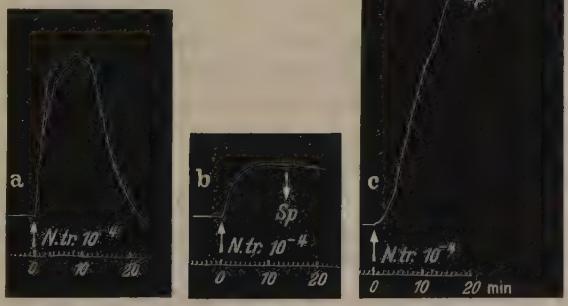


Abb. 6. R. temp., a = M. sartorius, b = M. gastrocnemius, c = M. rectus abdominis. Hebel 1:10. *N.tr.* = Cobragift. *Sp* = Spülung.

Kellaway und Holden[14] nimmt dagegen die direkte Muskelerregbarkeit schon vor Eintritt der „Curarisation" durch Cobragift stark ab.

Am Nerv-Muskelpräparat bietet sich mit der von uns angewandten Methodik etwa das gleiche Bild wie unter Bienengifteinwirkung. Cobragift 1:10000 läßt direkte und indirekte Erregbarkeit nach ungefähr 20 bis 30 min gleichzeitig auf der Höhe der Kontraktur erlöschen, was etwa den Beobachtungen von Gautrelet und Halpern[9] entspricht. Bei der geringeren Konzentration 1:100000 macht sich innerhalb von 60 min noch kein deutlicher Unterschied zwischen direkter und indirekter Kontraktionshöhe bemerkbar, so daß also auch Cobragift in der angewandten Konzentration und innerhalb der beobachteten Zeit am Froschmuskel keine mit dieser Methode erfaßbare „curareartige" Wirkung erkennen läßt.

Besprechung.

Unsere Versuche zeigen, daß Bienengift in geeigneten Konzentrationen am Froschmuskel Veränderungen hervorruft, die sich in

Kontraktur und in Verminderung und schließlich Verlust der elektrischen Erregbarkeit äußern. Bei den Kontrakturen kann man fast regelmäßig eine rasche Initialverkürzung von einer sich langsamer entwickelnden Kontraktur unterscheiden, deren Beginn gewöhnlich in die Wiedererschlaffungsphase der Anfangsverkürzung fällt, so daß das Bild an eine unter Veratrineinfluß ablaufende Einzelzuckung erinnert. Am Sartorius löst sich die Verkürzung in der Giftlösung innerhalb kurzer Zeit spontan, während Gastrocnemius und Rectus in Dauerkontrakturen verharren.

Die Verkürzungen sind praktisch irreversibel, atropin- und novocainresistent und ihr Verlauf wird auch durch anodische Polarisation in der von Fleckenstein, Hille und Adam[26] beschriebenen Anordnung nicht beeinflußt, so daß sie in die Gruppe der sogenannten Schädigungskontrakturen eingereiht werden können. Atropin scheint sogar die Verkürzung des M. rectus etwas zu verstärken. Auch das Verhalten des Membranpotentials im Verlauf der Kontraktur spricht für eine Schädigung des Muskels durch Bienengift, da der Wiederverlängerung des Sartorius in der kontrakturerzeugenden Giftlösung keine Repolarisation parallel geht, ja das Membranpotential dabei sogar noch weiter absinkt. Möglicherweise liegt der raschen Initialverkürzung wenigstens zum Teil eine echte Erregung zugrunde, da sie am Gastrocnemius durch längere Novocainvorbehandlung unterdrückt werden kann.

Die rasche Anfangsverkürzung der Muskeln kann offensichtlich nur von höheren Giftkonzentrationen (bis 1:100000) hervorgerufen werden, denn geringere (1:500000, 1:1000000) lassen lediglich noch die langsam sich entwickelnde Verkürzung erkennen, und diese nur in abgeschwächter oder protrahierter Form.

In calciumfreier Tyrodelösung wird nach unseren Beobachtungen die Bienengiftkontraktur deutlich abgeschwächt. Dies ist auffällig, weil bekanntlich im allgemeinen Kontrakturwirkungen durch Calciumentzug verstärkt werden (Riesser[30]), wobei sich wahrscheinlich die relative Vermehrung des Kaliums in der Nährlösung geltend macht. Die umgekehrte Beeinflussung der Bienengiftverkürzung durch Calciumentzug kann jedoch auf der Basis der Hypothese der Kaliumvermehrung nicht erklärt werden und spricht für einen von dieser Vermehrung unabhängigen Mechanismus.

Auf wiederholte Bienengiftapplikation gleicher Dosierung sprechen die Muskeln nicht mehr an, ein Vorgang, der vielleicht in der Verminderung des Membranpotentials durch die erste Giftdosis begründet liegt, so daß erst höhere, stärker depolarisierende Dosen wieder einen Effekt haben. Am isolierten Darm entfalten wiederholte Dosen ebenfalls nur eine immer schwächere Wirkung (Richter[17], Sartorius[31]). Auch hinsichtlich der relativen Hitzeresistenz in höheren Konzentrationen verhält sich die an quergestreifter Muskulatur wirksame Komponente des Bienengiftes ähnlich wie seine darmwirksame[17], so daß sie möglicherweise mit dieser identisch ist.

Für die Beständigkeit der Bienengiftkontraktur am Rectus und Gastrocnemius ist wahrscheinlich das reichlich ausgebildete Bindegewebe dieser Muskeln mit verantwortlich zu machen. Es ist nicht nur das Verhältnis von tonischen zu nichttonischen Fasern, das den Kontrakturverlauf bestimmt; denn dieser gleicht sich beim Rectus nach Abziehen der Fascien weitgehend dem beim Sartorius beobachteten an. Die bindegewebige Fascie selbst wird anscheinend durch Bienengift nicht nachhaltig beeinflußt, was aber nicht unbedingt gegen eine Beteiligung des Bindegewebes an den Kontrakturen spricht; sie macht sich anscheinend erst bei funktioneller Einheit von Muskelfaser und Fascie geltend.

Die Abnahme der Muskelkontraktionen unter Bienengift, die synchron mit den Kontrakturen verläuft, scheint bei Gastrocnemius und Rectus zumindest zum Teil eine Folge der Dauerverkürzungen dieser Muskeln zu sein. Auch beim Sartorius erreichen die Kontraktionen im Maximum der Kontraktur ihre geringste Höhe, nehmen aber in der Wiederverlängerungsphase wieder zu und fallen dann langsam bis zur Unerregbarkeit des Muskels ab.

Am Nerv-Muskelpräparat des Gastrocnemius läßt sich mit unserer Versuchsanordnung im Bienengift weder bei der Konzentration 1:10000 noch bei der von 1:100000 eine „curareartig" wirkende Komponente nachweisen. Nach eigenen Versuchen besitzt jedoch Bienengift am Warmblütermuskel eine eindeutige blockierende Wirkung auf die motorische Endplatte, so daß offenbar der Froschmuskel diesem Wirkungsfaktor des Giftes gegenüber resistenter ist.

Auch verschiedene Schlangengifte verursachen irreversible Kontrakturen und Beeinträchtigung der elektrischen Erregbarkeit[1–3]. Die durch Cobragift hervorgerufenen Verkürzungen sind wie die durch Bienengift ausgelösten atropin- und novocainresistent und werden ebenfalls durch Atropin leicht gesteigert[32]. Außerdem sollen Cobragift und andere Schlangengifte auch am Froschmuskel eine sogenannte „curareartige" Wirkung besitzen[1–16]. Nach unseren Vergleichsversuchen sind in der Tat die Kontrakturen durch Bienen- und Cobragift am Froschmuskel einander ähnlich, und auch die direkte elektrische Erregbarkeit wird ähnlich beeinflußt. Hierbei stimmen die Myogramme des Sartorius am besten überein und auch am Gastrocnemius zeigt sich bis auf die fehlende rasche Anfangsverkürzung ein ähnliches Bild wie unter Bienengift. Beim Rectus ist es insofern etwas abweichend, als die Kontraktur unter Cobragift zwar ebenfalls ohne schnelle Initialverkürzung, also von vornherein langsam, aber doch im ganzen steiler verläuft und dementsprechend bedeutend früher ihr Maximum erreicht als unter Bienengift.

Der steilere Kontrakturanstieg beim Rectus ließe sich dadurch erklären, daß die Hyaluronidase des Cobragiftes[33] am Muskel wahrscheinlich eine Permeabilitätserhöhung hervorruft und damit die Wirkung des Muskelfaktors unterstützt, jedoch muß man sich bei dieser Deutung fragen, warum nicht auch der Gastrocnemius schneller eine stärkere Verkürzung erreicht. Vielleicht ist aber der Grund hierfür in der Dicke des Muskels zu suchen. Im Bienengift wird bisher keine Hyaluronidase angenommen[34], doch würde ihre Anwesenheit in Einklang mit unserem Befund stehen, daß die Bienengiftkontrakturen in calciumfreier Nährlösung abgeschwächt werden. Calcium ist bekanntlich ein Aktivator dieses Fermentes[34].

Am Nerv-Muskelpräparat besitzt auch Cobragift 1:10000 und 1:100000 unter unseren Versuchsbedingungen keinen nachweisbaren „curareartigen" Effekt, so daß seine Wirkungsqualitäten am Froschmuskel weitgehend denen von Bienengift gleichen.

Die bekannten Analogien zwischen Bienengift und gewissen Schlangengiften[17–23] lassen vermuten, daß an den beschriebenen Muskelwirkungen wenigstens zum Teil ein gemeinsamer Giftfaktor beteiligt ist, zumal diese Gifte auch am Herzmuskel stärkere, teilweise irreversible Kontrakturen verursachen[2, 18].

Zusammenfassung.

Bienengift verursacht am isolierten Skelettmuskel des Frosches Kontrakturen, die je nach Art des Muskels (Sartorius, Gastrocnemius, Rectus abdominis) verschiedenen Verlauf zeigen, wobei eine Beteiligung des Bindegewebes möglich ist.

Die Verkürzungen lassen sich nach Irreversibilität, Resistenz gegen Atropin und Novocain, Permanenz unter anodischer Polarisation, sowie nach dem Verhalten des Membranpotentials in die Gruppe der sogenannten Schädigungskontrakturen einstufen.

Die elektrische Erregbarkeit nimmt mit der Entwicklung der Kontrakturen ständig ab.

Am Nerv-Muskelpräparat weisen direkte und indirekte Kontraktionshöhen keinen nennenswerten Unterschied auf, so daß Bienengift in der benutzten Versuchsanordnung keine „curareartige" Wirkung erkennen läßt.

Literatur.

[1] Houssay, B. A., J. Negrete et P. Mazzocco: C. r. Soc. Biol. Paris **87**, 823 (1922). — Rev. Asoc. Méd. Argent. **35**, 185 (1922); zit. n. Kellaway (14—16). — [2] Schaumann, O.: Behringwerk-Mitteilungen, H. 7, S. 33 (1936). — [3] Fulchignoni, E.: Arch. di Fisiol. **35**, 377 (1936). — [4] Brunton, L., and J. Fayrer: Proc. Roy. Soc. **21**, 358; **22**, 68 (1873/74); zit. n. Ragotzi (5). — [5] Ragotzi, V.: Arch. f. Pathol. Anat. **122**, 201 (1890). — [6] Arthus, M.: Arch. internat. Physiol. **10**, 161 (1910). — [7] Cushny, A. R., and S. Yagi: Phil. Trans. Roy. Soc. B. **208**, 1 (1918); zit. n. Kellaway (14—16). — [8] Houssay, B. A., u. S. Pave: Rev. Asoc. Méd. Argent. **35**, 166 (1922); zit. n. Kellaway and Holden (14). — [9] Gautrelet, J., et N. Halpern: C. r. Soc. Biol. Paris **113**, 1486 (1933). — [10] Cicardo, V. H.: C. r. Soc. Biol. Paris **120**, 732 (1935); zit. n. Ber. Physiol. **93**, 446 (1936). — [11] Sarkar, M. K., and S. R. Maitre: Amer. J. Physiol. **163**, 209 (1950). — [12] Kyu, K.: J. Med. Assoc. Formosa **32**, 6 (1933); zit. n. Ber. Physiol. **79**, 720 (1934). — [13] Nakamura, T.: Acta jap. Med. trop. **1**, 155 (1939); zit. n. Ber. Physiol. **121**, 448 (1940). — [14] Kellaway, C. H., and H. F. Holden: Austr. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **10**, 167 (1932). — [15] Kellaway, C. H., R. O. Cherry and F. E. Williams: Austr. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **10**, 181 (1932). — [16] Kellaway, C. H.: Bull. Hopkins Hosp. **60**, 18 (1937). — [17] Richter, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **189**, 172 (1938). — [18] Flury, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **85**, 319 (1920). —

[19] Gessner, O.: Handb. d. exper. Pharmakol., Erg. Werk **6**, 71 (1938). — [20] Forster, K. A.: Pharmazie **4**, 499 (1949). — [21] Belfanti, S.: Biochem. Z. **154**, 148 (1924). — [22] Fleckenstein, A., H. Tippelt u. H. Kroner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 380 (1950). — [23] Fleckenstein, A., G. Berg, J. Gayer u. S. Schönig: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 265 (1951). — [24] Wacholder, K.: Pflügers Arch. **226**, 255 (1931). — [25] Kopyloff, G.: Pflügers Arch. **153**, 219 (1913). — [26] Fleckenstein, A., H. Hille u. E. W. Adam: Pflügers Arch. **253**, 264 (1951). — [27] Fleckenstein, A.: Pflügers Arch. **253**, 38 (1950). — [28] Rössel, W.: Pflügers Arch. **253**, 224 (1951). — [29] Fleckenstein, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 416 (1951). — [30] Riesser, O.: Muskelpharmakologie und ihre Anwendung in der Therapie der Muskelkrankheiten. Bern: Medizinischer Verlag Hans Huber 1949. — [31] Sartorius, H.: Diss. Würzburg 1950. — [32] Houssay, B. A., et P. Mazzocco: C. r. Soc. Biol. Paris **93**, 1120 (1925). — [33] Zeller, E. A.: Adv. enzymol. **8**, 459 (1948). — [34] Werle, E., F. Turtur u. R. Bauereis: Biochem. Z. **319**, 337 (1949).

Dr. Hans Thilo Hofmann, Bad. Anilin- u. Sodafabrik, Ludwigshafen a. Rhein, Gewerbehygienisch-Pharmakologisches Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 534—539 (1952).

Aus der I. Med. Universitätsklinik Wien (Vorstand: Professor Dr. E. Lauda).

Zum Problem des Leukocytenstoffwechsels.

III. Mitteilung.

Einfluß von N-Lost und N-Lost + Urethan auf den Stoffwechsel myeloisch-leukämischer Zellen.

Von

E. Keibl, K. H. Spitzy und L. Storch.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Dezember 1951.)

In den vorangegangenen Mitteilungen[1, 2] erwiesen sich die Stoffwechselabweichungen bei leukämischen Zellen, zum Teil unter Therapieeinfluß, als Zeichen einer Schädigung der peripheren Zellen oder der Blutbildungsstätten. Da aus dem Stoffwechselverhalten gewisse Rückschlüsse auf den Angriffspunkt der jeweiligen Leukämietherapie gewonnen werden konnten, setzten wir unsere Untersuchungen unter N-Lost-Therapie fort.

Nach vorliegenden Literaturberichten dürfte die Wirkung des N-Lost eine dreifache sein. Erstens scheint nach Cori ein primärer Effekt auf die Zelloberfläche mit Permeabilitätsstörung und Freisetzung von Enzymen zu bestehen[3, 4]. Zweitens wird von mehreren Autoren ein Einfluß auf eine Anzahl von Enzymen[5], insbesondere auf Hexokinase, Phosphokinasen[6, 7], Pyruvat-[8] und Cholinoxydase (letzteres möglicherweise wegen ähnlicher Konstitution wie Cholin[5]) angenommen. Drittens ist eine der ionisierenden Strahlung ähnliche antimitotische Wirkung nachgewiesen[9–13], die auf das Zelleiweiß[14] bzw. direkt auf die Desoxyribonucleinsäure[15] zur Geltung kommen soll. In vitro wie in vivo erzeugt Lost eine Hemmung des Zellstoffwechsels[3, 4, 16–19]. Durch Freiwerden von Radikalen im Lösungsmittel soll es nach neuen Untersuchungen auch zu einer indirekten Milieuwirkung kommen[20]. In einer Klassifizierung der bisher bekannten cytostatischen Substanzen wird N-Lost den sogenannten Ruhekerngiften zugeordnet[21].

Nach den bisherigen Ergebnissen der Literatur ist demnach für Leukocyten eine Wirkung auf die peripheren Zellen, die Blutbildungsstätten und das Blutmilieu zu erwarten. Um den Angriff auf die leukämischen Gewebe zu verstärken, wendeten wir bei einigen Patienten eine kombinierte N-Lost-Urethan-Therapie an[22].

Material und Methode.

Zur Herstellung der Zellsuspensionen wurde bei 10 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie Blut entnommen. 5 Patienten bekamen täglich 2,5 mg

N-Lost i.v.* 5 Patienten erhielten täglich eine i.v. Mischspritze von 1,25 mg N-Lost und 1,5 g Urethan. In 4tägigen Abständen wurde das Blut der Kubitalvene entnommen und nach Gewinnung der Leukocyten die Zellsuspension in Bicarbonatpuffer mit Glucose nach WARBURG veratmet.

Festgestellt wurden Atmung, aerobe und anaerobe Glykolyse und die Steilheit des Atmungsabfalles, bezogen auf 10^7 Zellen, wie es in unserer ersten Mitteilung[1] ausführlich beschrieben wurde.

Ergebnisse.

1. Behandlung mit N-Lost.

5 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie reagierten auf täglich 2,5 mg N-Lost mit promptem Abfall der Leukocytenzahlen, der

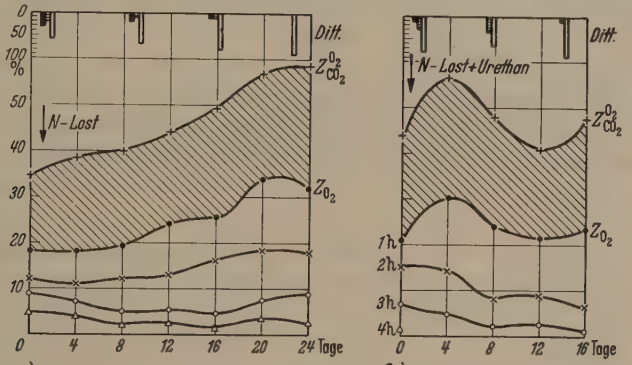


Abb. 1. Verlauf der Änderung des Differentialblutbildes (Diff), der Atmung ($-Z_{O_2}$) der 1. bis 4. Std und der aeroben Glykolyse ($Z^{O_2}_{CO_2} + Z_{O_2}$) bei Therapie mit a) Stickstoff-Lost und b) Lost-Urethan.
▬ Myeloblasten ▬ Myelocyten ▭ Reife Zellen

um den 10. Tag einsetzte und um den 20. Tag zu normalen Werten führte. Dementsprechend gingen Milz- und Leberschwellung zurück. Je nach Eintreten des Leukocytenabfalles dauerte die Behandlung zwischen 18 und 27 Tagen.

Die Abb. 1a zeigt einen Fall, der 20 Tage mit N-Lost behandelt wurde. Die gemessenen Atmungswerte ($-Z_{O_2}$) und die Werte der aeroben Glykolyse (aufgetragen als Extrakohlensäure $Z^{O_2}_{CO_2} + Z_{O_2}$) stiegen während der Behandlung langsam an, während sich das Differentialblutbild relativ schnell im Sinne einer Ausreifung veränderte. Im Vergleich zu den für diese Zusammensetzung gültigen Werten waren die gefundenen Werte zu Beginn der Behandlung bis zum 10. Tag eher unter dem zu erwartenden Niveau, die der aeroben Glykolyse etwas über dem zu erwartenden. Am Ende der Behandlung stieg die Atmung wieder an, blieb aber immer im Normalbereich. Die aerobe Glykolyse

* Verwendet wurde das Methyl-bis-(β-Chloräthyl)-amin-Chlorhydrat der Fa. EBEWE, das zum Unterschied von anderen Präparaten in gelöster Form in Ampullen geliefert wird.

stieg gegen Ende der Behandlung deutlich an (bis +20%). Die anaerobe Glykolyse blieb im Normalbereich. Der Atmungsabfall wurde steiler, was aus den tiefen, sich im Verlauf der Behandlung kaum ändernden Atmungswerten der 2. Stunde zu ersehen ist. Tab. 1 zeigt die höheren Werte für die Steilheit des Atmungsabfalles in vitro (Tangens des Neigungswinkels log Z_{O_2} zur Zeitachse).

Tabelle 1. *Durchschnittliche Atmungs- und Atmungsabfallwerte myeloischer Leukocyten ohne Behandlung, während N-Lost und N-Lost mit Urethan kombinierter Behandlung.*

Verteilung	a		b		c		d		e	
Myeloblasten . . .	50		30		10		—		—	
Myelocyten . . .	30		50		40		40		10—0	
Stab.- u. Segt.-kern.	20		20		50		60		90—100	
	Z_{O_2}	tg	Z_{O_2}	tg	Z_{O_2}	tg	Z_{O_2}	tg	Z_{O_2}	tg
ohne Behandlung .	18,3	0,52	23,3	0,64	25,1	0,76	24,2	0,9	34,2	1,38
N-Lost Tage . . .										
1— 8. .			19,2	0,6						
9—16. .					24,7					
17—24. .						0,9	24,5	1,1	34,6	1,5
N-Lost Tage										
+ Urethan 1— 8.			27,3	0,9	28,6	1,2				
9—16.							21,8	8,5	28,1	13,8
17—24.									24,0	19,4

2. Behandlung mit N-Lost und Urethan.

Auf Behandlung mit 1,25 mg N-Lost und 1,5 g Urethan i.v. ergaben sich auffallende Änderungen des Zellstoffwechsels. Die Atmung stieg in den ersten 8 Tagen an, um dann bis zum Ende der Behandlung (15 bis 23 Behandlungstage) deutlich (bis —30%) im Vergleich zum prompten Auftreten reifer Zellen abzufallen (Abb. 1 b). Die aerobe Glykolyse fiel zur Zeit der Atmungssteigerung, d. h. zu Beginn der Therapie, deutlich ab (bis —25%) (Pasteur-Effekt). Bei Auftreten des Atmungsabfalles stieg die aerobe Glykolyse deutlich an. Die Steilheit des Atmungsabfalles geht aus Tab. 1 hervor.

Diskussion.

Während in unserer 2. Mitteilung[2] nach Urethan, Röntgen und Colchizin ein Ansteigen des Zellstoffwechsels nachgewiesen werden konnte, war bei der Behandlung mit N-Lost bzw. mit N-Lost-Urethan zum Teil ein deutliches Absinken desselben festzustellen (Abb. 2). Ganz allgemein zeigt sich bei einer Schädigung, sofern diese nicht zu hohe Grade erreicht, eine Steigerung der Atmung und bei stärkerer Zunahme der Schädigung ein Abfall derselben[23, 24]. Das Verhalten der aeroben

Glykolyse ist dann besonders als ein Schädigungszeichen zu werten, wenn sie gleichsinnig mit der Atmung ansteigt[25]. Diese einfachen Schädigungszeichen treten auch bei Lost- und bei Lost-Urethan-Behandlung auf. Bei Anwendung von Lost allein sind das relative Ansteigen der Atmung und das gleichzeitige Ansteigen der Glykolyse erst gegen Ende der Behandlung als Zeichen einer peripheren Zellschädigung zu bemerken. Bei der kombinierten Lost-Urethan-Therapie läßt hingegen der sofortige Anstieg der Atmung mit zunehmendem Abfall der Glykolyse einen prompten Einfluß auf die Blutbildungsstätten vermuten. Es tritt hier, wie aus Abb. 2 zu erkennen ist, ein Stoffwechselverhalten zutage, das dem bei der Anwendung von Urethan allein entsprechen würde, aber nicht am 20., sondern bereits am 4. Tage zur Geltung kommt. Im weiteren Verlauf der Behandlung kommt es jedoch zu einem rapiden Absinken der Atmung mit gleichzeitigem Anstieg der Glykolyse, was wieder als Zeichen einer peripheren Zellschädigung zu werten ist. Das Absinken der Atmung spricht für eine höhergradige Zellschädigung, die wahrscheinlich vor allem durch das Lost hervorgerufen wird.

Zu ähnlichen Schlüssen gelangt man bei Betrachtung des Atmungsabfalles in vitro. In Abb. 1 geht aus dem Auseinanderweichen der Erst- und Zweitstundenwerte deutlich der zunehmend steile Abfall der Atmung in vitro hervor. Bei der Kombination mit Urethan ist der Abfall so steil, daß bereits nach 4 Tagen in vitro nach 3 Std ein Atmungsstillstand eingetreten ist.

Aus dem Stoffwechselverhalten läßt sich schließen, daß Lost als schweres Zellgift Atmung und Glykolyse zwar erst gegen Ende der Behandlung beeinflußt, wohl aber die Überlebensdauer der Leukocyten in vitro (steiler Atmungsabfall) erheblich einschränkt (was möglicherweise mit der Beobachtung einer „Leukolyse" nach Lost übereinstimmt[30]). Daß es dabei zur erwähnten Freisetzung von Enzymen kommen kann[3, 4], ist möglich, durch unsere Untersuchungsart aber nicht zu beweisen. Diese Art der Wirkung scheint bei der Behandlung mit Lost im Vordergrund zu stehen. Bei Kombination mit Urethan scheint durch das Lost die Bahn für die Urethanwirkung sehr bald freigemacht zu werden (Permeabilitätsänderung?), während später die Lostwirkung als Enzymhemmer in der Stoffwechselsenkung zur Geltung kommt.

Unter eingehender Berücksichtigung der Gesichtspunkte, die für die Charakterisierung des Schädigungs-Stoffwechsels maßgebend sind[26], kann auf Grund des Stoffwechselverhaltens der Leukocyten unter der Leukämietherapie auf den Grad der Schädigung der Zellen einerseits und auf das Auftreten veränderter Zellen durch Beeinflussung der Blutbildungsstätten andererseits geschlossen werden. Es ist selbstverständlich,

daß ein so hochgradiger Schädigungsstoffwechsel, wie er bei der kombinierten Lost-Urethan-Therapie um den 20. Tag auftreten kann, zum sofortigen Absetzen der Therapie Anlaß geben wird. Die praktische Erprobung dieser Kombination hat ergeben, daß bei Absetzen der Therapie, wenn die Leukocytenzahl 20000 erreicht hat, so schwere Stoffwechselveränderungen nicht auftreten und nach Absetzen keine langanhaltenden Schädigungen festzustellen waren.

Die Kombination von cytostatisch wirksamen Mitteln kann nur dann gegenüber ihrer bisher bekannten Anwendungsart einen Vorteil zeigen,

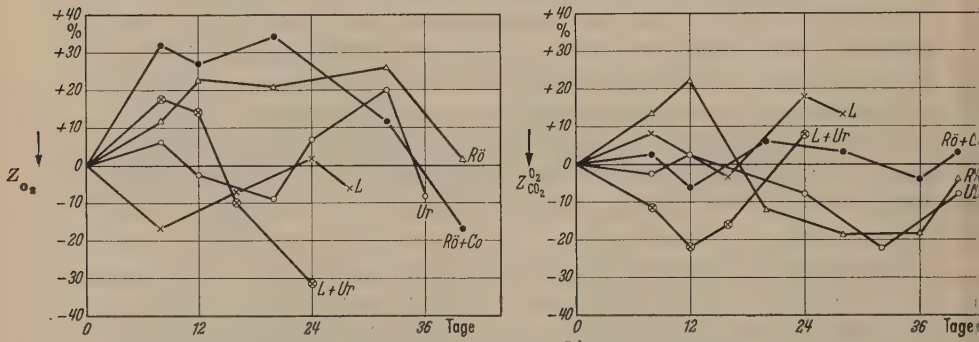


Abb. 2. Prozentuales Abweichen der Werte für Atmung a) und aerobe Glykolyse, b) myeloischer Leukocyten im Vergleich zum „Normalwert" unter Behandlung mit Urethan (U), Röntgen (Rö), Röntgen-Colchizin (Rö + Co), N-Lost (L) und Lost-Urethan (L + U).

wenn die Kombination durch die halben Einzeldosen und den verschiedenen Angriffspunkt sowohl ungefährlicher als auch wirkungsvoller wird. Wenn auch die klinische Beobachtung das wichtigste Kriterium einer Therapie darstellt, gibt die Beurteilung des Leukocytenstoffwechsels einen Hinweis für den Angriffspunkt der einzelnen Komponenten (Abb. 2). Von diesem Standpunkt aus gesehen hat sich nun gezeigt, daß die kombinierte Lost-Urethan-Therapie stoffwechselmäßig als günstige Kombination anzusehen ist, da es sich um die Kombination einer Lost-Frühwirkung mit einer Urethan-Spätwirkung handelt, die außerdem noch eine gegenläufige Tendenz aufweist.

Wie weit unsere bisherigen klinischen Erfahrungen mit den Ergebnissen des Stoffwechsels der leukämischen Zellen unter einer kombinierten Therapie in Einklang zu bringen sind, wird an anderer Stelle berichtet werden[22].

Zusammenfassung.

An Leukocytensuspensionen von 10 Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie wurden nach Behandlung mit N-Lost und N-Lost + Urethan Atmung und Glykolyse nach Warburg bestimmt.

Auf Behandlung mit Lost traten geringe Schwankungen, die gegen Ende der Behandlung deutlicher wurden, auf. Bei Kombination mit Urethan war vorerst eine Atmungssteigerung mit Senkung der Glykolyse, später eine deutliche Atmungssenkung mit Erhöhung der Glykolysewerte nachzuweisen.

Die Stoffwechselveränderungen wurden mit dem Schädigungsstoffwechsel und mit der Wirkung auf Blutbildungsstätten in Beziehung gebracht.

Literatur.

[1] Keibl, E., u. K. H. Spitzy: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 162 (1951). — [2] Keibl, E., u. K. H. Spitzy: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 365 (1951). — [3] Gilman, A., and F. S. Philips: Science (Lancaster, Pa.) **103**, 409 (1946). — [4] Barron, E. S. G., G. R. Bartlett, Z. B. Miller, J. Meyer and J. E. Seegmiller: J. of Exper. Med. **87**, 512 (1948). — [5] Barron, E. S. G., G. R. Bartlett and Z. B. Miller: J. of Exper. Med. **87**, 489 (1948). — [6] Dixon, M., and D. M. Needham: Nature **158**, 432 (1946). — [7] Prescott, B., and H. Waelsch: J. of Biol. Chem. **164**, 331 (1946). — [8] Peters, R. A.: Nature **159**, 149 (1947). — [9] Auerbach, C.: Drosophila Inf. Serv. (D.I.S.) **14**, 48 (1943). — [10] Auerbach, C.: Exper. Cell Research, Suppl. 1, 93 (1949). — [11] McElroy, W. D., J. E. Cushing and H. Miller: J. Cell Comp. Physiol. **30**, 33 (1947). — [12] Tatum, E. W.: Cold Spring Harbor Symp. **11**, 278 (1946). — [13] Horowitz, N. H., M. B. Houlahan, M. G. Hungate and B. Wright: Science (Lancaster, Pa.) **104**, 233 (1946). — [14] Cashmore, A. E., and H. MacCombie: J. Chem. Soc., Lond. **123**, 2884 (1923). — [15] Koller, P. C.: Exper. Cell Research, Suppl. I, 89 (1949). — [16] Berenblum, I., L. P. Kendal and J. W. Orr: Biochemic. J. **30**, 709 (1936). — [17] Greenberg, D. M., and T. Winnick: J. of Biol. Chem. **173**, 199 (1948). — [18] Lutwak-Mann, C.: Nature **164**, 607 (1949). — [19] Danielli, J. F.: Cell Physiology and Pharmacology, Elsevier Publ. Cp. inc. (1950). — [20] Ross, W. C. J.: Nature **165**, 808 (1950). — [21] Heilmeyer, L.: Schweiz. med. Wschr. **24**, 539 (1949). — [22] Keibl, E.: Wien. med. Wschr. (im Erscheinen). — [23] Locker, A., u. K. H. Spitzy: Experientia **7**, 350 (1951). — [24] Benda, L., A. Locker u. E. Rissel: Z. exper. Med. **117**, 519 (1951). — [25] Druckrey, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **180**, 231 (1936). — [26] Locker, A., u. K. H. Spitzy: Z. exper. Med. **118**, 155 (1951). — [27] Fochem, K., E. Reimer u. J. Schmid: Wien. Z. inn. Med. **32**, 31 (1951). — [28] Keibl, E., u. A. Lötsch: Schweiz. med. Wschr. **9**, 228 (1950). — [29] Deutsch, E., E. Keibl u. K. H. Spitzy: Radiologia Austriaca **6** (1951). — [30] Ninni, M.: Experientia **6**, 22 (1950).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 540—555 (1952).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg.

Zur Kinetik der Cholinesterasen-Hemmung durch Prostigmin*.

Von

WOLFGANG HARDEGG.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Dezember 1951.)

Zu den stärksten Hemmstoffen der Cholinesterasen (ChE) gehören Physostigmin und sein synthetisches Analog Prostigmin; dazu kamen in der neueren Zeit verschiedene Alkylphosphate, wie Diisopropylfluorphosphat, Tetraäthylpyrophosphat, Parathion usw. Zur Beurteilung der Wirkungen dieser Substanzen, die nach der heute herrschenden Meinung im allgemeinen durch eine ChE-Hemmung befriedigend erklärt werden können, gehört verständlicherweise eine eingehende Kenntnis des Mechanismus, wie die ChE beeinflußt und inaktiviert wird. Die Kinetik der Hemmung wurde daher schon oft, teilweise mit sehr widersprechendem Ergebnis, untersucht. Es kann hier nicht unsere Aufgabe sein, einen vollkommenen Überblick über das Problem der ChE-Hemmung zu geben, sondern wir wollen nur einige Punkte herausgreifen, die uns für die Beurteilung und das Verständnis der Wirkung der ChE-Hemmstoffe wesentlich erscheinen.

In zahlreichen Arbeiten wurde über folgende Erscheinung berichtet: Wird ein sogenannter reversibler Hemmstoff, wie z. B. Physostigmin oder Prostigmin mit einem ChE-Präparat eine Zeitlang inkubiert, und wird nach Einstellen des Gleichgewichtes zwischen Ferment und Hemmstoff die Hydrolyse von Acetylcholin (ACh) verfolgt, so wird eine konvexe, nach aufwärts S-förmig gekrümmte Kurve gewonnen, wenn die gespaltene Menge an ACh gegen die Zeit aufgetragen wird (siehe Abb. 1). Die Geschwindigkeit der Spaltung nimmt mit der Zeit zu. Diesen Befund konnten wir in zahlreichen Versuchen mit Prostigmin bestätigen. Die Folgerungen, die aus dieser Erscheinung gezogen wurden, scheinen uns aber nicht stichhaltig zu sein.

Von ALDRIDGE[1], AUGUSTINSSON[4], AUGUSTINSSON und NACHMANSOHN[6], GOLDSTEIN[11, 12, 13, 14], MYERS[24, 25], ROEPKE[26], STRAUS und GOLDSTEIN[28] u. a. wird angenommen, daß die offensichtlich auftretende Enthemmung der ChE nach Zusatz des Substrates dadurch bedingt sei, daß das ACh den Hemmstoff langsam vom Ferment verdrängt, und zwar so lange, bis sich ein neues Gleichgewicht eingestellt

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Hoffmann-La Roche A. G.

hat. ALDRIDGE[1] z. B. schreibt wörtlich: "This (= die Abnahme der Hemmung) can only be due to replacement by acetylcholine of physostigmine molecules on the active groups of the cholinesterase." Aus der Reaktionsgeschwindigkeit nach Einstellen des „Gleichgewichtes" zwischen Hemmstoff und Substrat am Ferment würde sich danach die für die gewählte ACh-Konzentration entsprechende Hemmung durch Vergleich mit der ungehemmten Spaltkurve bestimmen lassen. Auf diese Weise wurde von AUGUSTINSSON und NACHMANSOHN[6] die Dissoziationskonstante K_I für den Ferment-Hemmstoffkomplex bei Electrophorus-ChE für Prostigmin auf $6{,}1 \cdot 10^{-8}$ und für Physostigmin auf $1{,}6 \cdot 10^{-7}$ berechnet.

Diese Auffassung führte zu der Folgerung, daß die Hemmung der ChE durch Physostigmin bzw. Prostigmin eine kompetitive sei. D. h. daß sich die Hemmstoffe mit derselben Atomgruppe des Fermentmoleküls verbinden, mit dem auch das Substrat, in unserem Fall ACh, reagiert. Bei konstanter Hemmstoff- und Fermentkonzentration ist die prozentuale Hemmung der Substratspaltung dabei um so geringer, je höher die Substratkonzentration selber gewählt wird. Im Fall der echten ChE (MENDEL u. Mitarb.[22]) oder Acetylcholinesterase (AUGUSTINSSON und NACHMANSOHN[7]), die durch höhere Substratkonzentrationen gehemmt wird, wird die optimale Substratkonzentration auf höhere Werte verschoben. Eine kompetitive Hemmung der echten ChE wird auch bei anderen Substanzen, wie Cholin (siehe AUGUSTINSSON[3]), d-Tubocurarin (eigene Versuche), 3-Oxyphenyltrimethylammonium (WESCOE u. Mitarb.[29]) usw., gefunden. Dabei fehlt aber die S-förmige Verkrümmung der Spaltkurve. Die Reaktion verläuft von Anfang an gehemmt und praktisch linear, solange die Substratmenge noch nicht merklich abgenommen hat. Der Unterschied, z. B. zwischen der Prostigmin- und der Cholinhemmung, wo im ersten Fall die S-förmige Verkrümmung der Spaltkurve auftritt und im zweiten fehlt, wird darauf zurückgeführt, daß sich das Gleichgewicht zwischen Prostigmin und Substrat langsam, für uns kommensurabel, einstellt, das zwischen Cholin und Substrat dagegen in unmeßbar kurzer Zeit.

In dieser Arbeit soll über verschiedene Versuche berichtet werden, die mit der Ansicht, daß Prostigmin ein kompetitiver Hemmstoff der ChE ist, nicht ganz in Einklang stehen. Es werden die Beeinflussung der Prostigminhemmung durch Cholin, d-Tubocurarin und 3-Oxyphenyltrimethylammonium und ein grundsätzlicher Unterschied der Cholinwirkung einerseits und der Wirkung von d-Tubocurarin und 3-Oxyphenyltrimethylammonium andererseits beschrieben. Auf eine mathematische Auswertung unserer Ergebnisse nach den bisher bei der ChE angewandten Regeln, die auf den Theorien von MICHAELIS[23] bzw. HALDANE[15] basieren, haben wir aus folgendem Grund bewußt verzichtet. Es wird ja allgemein angenommen, daß die Kinetik der ACh-Spaltung durch die Serum-ChE dem Ansatz von MICHAELIS und die der Spaltung durch die Erythrocyten-ChE dem Ansatz von HALDANE folgen. Wir haben nun an anderer

Stelle (Hardegg und Schaefer[16]) zeigen können, daß dies *nicht* der Fall ist. In den von uns beobachteten Ergebnissen treten teilweise recht beachtliche Abweichungen von den nach den beiden Ansätzen zu fordernden theoretischen Reaktionsabläufen auf. Die ACh-Spaltung durch die von uns als Fermentquelle benutzte menschliche Erythrocyten- und Serum-ChE folgt jedoch recht exakt dem Ansatz von Schaefer[27], der sich in der Modellvorstellung grundsätzlich von den Ansätzen von Michaelis bzw. von Haldane unterscheidet. Die Gleichung von Schaefer ist in ihrer augenblicklichen Form nur für die ACh-Spaltung allein gültig; eine Erweiterung zur formalen Beschreibung der Beeinflussung der ACh-Hydrolyse durch andere Substanzen hoffen wir in Kürze geben zu können. Trotz der sich aus der Schaeferschen Gleichung ergebenden Modellvorstellung haben wir die in der Fermentkinetik gebräuchlichen Begriffe der kompetitiven bzw. der nicht-kompetitiven Hemmung beibehalten, da sie nach unseren augenblicklichen Überlegungen auch in unsere neue Modellvorstellung hineinpassen und durch andere zur Zeit nicht ersetzt werden können.

Ein Teil der in dieser Arbeit beschriebenen Probleme wurde unabhängig von uns bereits früher von Maier und Bammer[21] behandelt, die in vielen Punkten zu gleichen Schlußfolgerungen wie wir kamen.

Methodik.

Die ChE-Aktivität wurde manometrisch nach dem Vorgehen von Ammon[2], modifiziert nach Schaefer[27], bestimmt. Die Ablesungen am Warburg-Manometer begannen sofort nach Zusatz des Substrates und erfolgten so oft, daß der Verlauf der Spaltung in jedem einzelnen Ansatz genau festgelegt werden konnte. Bis zu einer ACh-Konzentration, bei der sich der Ringer-Puffer nicht merklich erschöpfte — in unseren Ansätzen von 2 cm^3 etwa 6 mg ACh —, wurde die Reaktion so lange verfolgt, bis alles zugegebene Substrat gespalten war. Als Lösungsmittel diente *Krebs*-Ringer-Lösung (KR) ohne Calcium (0,122 mol NaCl, 0,0049 mol KCl, 0,00124 mol KH_2PO_4, 0,00124 mol $MgSo_4 + 7\ H_2O$ und 0,0245 mol $NaHCO_3$), als Substrat Acetylcholin-Chlorid* in Konzentrationen zwischen $2{,}1 \cdot 10^{-3}$ und $8{,}3 \cdot 10^{-2}$ mol, das jeweils vor dem Versuch frisch in KR gelöst wurde. Gesunden Versuchspersonen wurde aus der Cubitalvene Blut entnommen, die Gerinnung durch Zusatz von 10 mg Na-Citrat/cm^3 Blut verhindert. Das Serum wurde durch Zentrifugieren von den Erythrocyten getrennt und letztere 3mal mit KR gewaschen. Pro Ansatz (Endvolumen 2,0 cm^3) wurden 0,5 cm^3 abzentrifugiertes Serum bzw. Erythrocytensuspension, 1:5 mit KR verdünnt, verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden vor jedem Versuch mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 und 95% N_2 für 5 min durchströmt. Der p_HWert des Reaktionsgemisches betrug 7,3 bis 7,4. Gearbeitet wurde bei einer Versuchstemperatur von 21,0° C. Wir benutzten Prostigmin-Bromid (Mol.-Gew. 303) als Hemmstoff, das ebenfalls in KR gelöst wurde.

Unsere Versuche führten wir hauptsächlich mit Erythrocyten-ChE durch. Diese gehört zu der Gruppe der spezifischen ChE, die auf Grund der heutigen Befunde für die Inaktivierung des ACh an dessen spezifischen Wirkungsorten vermutlich

* Handelsampullen der Deutschen Hoffmann-La Roche A. G.

verantwortlich ist. Die Erythrocyten-ChE wählten wir aus verschiedenen Gründen: Sie ist einmal relativ einfach und ohne große Hilfsmittel zu gewinnen. Zum anderen haben intakte Erythrocyten als Fermentquelle folgenden Vorteil: Es sind verschiedene Anhaltspunkte dafür vorhanden, daß die ChE an dem Ort ihrer Wirkung an spezifische Strukturen fest gebunden ist, vermutlich in den Membranen. Bei der Gewinnung von Fermentpräparaten aus Geweben werden diese Strukturen zerstört. SCHAEFER[27] hat festgestellt, und wir konnten es in weiteren Versuchen bestätigen, daß durch Hämolyse von Erythrocyten, also Zerstörung der Membran, die Aktivität der ChE beträchtlich abnimmt (die Diskrepanz zwischen unseren Befunden und den widersprechenden in der Literatur [ALDRIDGE[1], AUGUSTINSSON[3]] hoffen wir in Kürze erklären zu können). Wir haben demnach bei intakten Erythrocyten das Ferment zur Verfügung, das bei in vitro-Versuchen uns noch am besten über die tatsächlichen Eigenschaften der spezifischen ChE in vivo Auskunft geben kann.

Befunde mit Erythrocyten-ChE.

Die Verhältnisse bei der Serum-ChE sind, obwohl grundsätzlich wohl gleicher Natur, etwas komplizierter als bei der Erythrocyten-ChE und erfordern eine spätere Untersuchung.

Wir untersuchten als erstes die Abhängigkeit der Prostigminhemmung von der Substratkonzentration. In Abb. 1 ist der Verlauf der Spaltung von ACh durch Erythrocyten-ChE nach Vergiftung mit Prostigmin ($2{,}16 \cdot 10^{-6}$ mol) bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen neben den zugehörigen Kontrollen ohne Hemmstoff dargestellt. Es ist aus dem Kurvenverlauf die in der Einleitung beschriebene Abnahme der Hemmung mit der Zeit deutlich ersichtlich. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt fortlaufend zu und erreicht von einem bestimmten Punkt an, besonders bei der höheren Substratkonzentration, bei der die ACh-Menge relativ noch nicht so sehr abgenommen hat, einen konstanten Wert, die Hydrolyse verläuft von hier ab zunächst praktisch linear. Wechseln wir unsere Anordnung und geben das Prostigmin nicht primär zu dem Ferment, sondern lassen Substrat und Hemmstoff gleichzeitig auf die ChE einwirken, so sehen wir den in Abb. 2 festgelegten Reaktionsverlauf. Dieser unterscheidet sich von dem der Abb. 1 beträchtlich. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist anfangs fast so groß wie die der Kontrollen, sie nimmt dann fortlaufend ab und erreicht ebenfalls nach einer bestimmten Zeit wieder einen konstanten Wert. Vergleichen wir nun die Tangenten der entsprechenden Kurven der Abb. 1 und 2, nachdem die Hemmung konstant geworden ist, so finden wir, daß sie identisch sind. Die Aktivitätsverminderung durch Prostigmin ist hier in beiden Fällen gleich. In weiteren Untersuchungen, in denen wir die Substratkonzentration weiter variierten, konnten wir die Befunde von AUGUSTINSSON und NACHMANSON[6] bestätigen, daß diese Hemmung um so geringer ist, je höher die Substratkonzentration war, damit also kompetitiv.

Sehen wir uns jetzt die beiden Kurven mit verschiedenen ACh-Konzentrationen in Abb. 1 näher an, so finden wir folgende bemerkenswerte

Tatsache: Nehmen wir an, daß die Reaktionsgeschwindigkeit, nachdem die Hemmung konstant geworden ist, für uns ein relatives Maß für die Konzentration an ungehemmter ChE ist, so läßt sich, wenn die

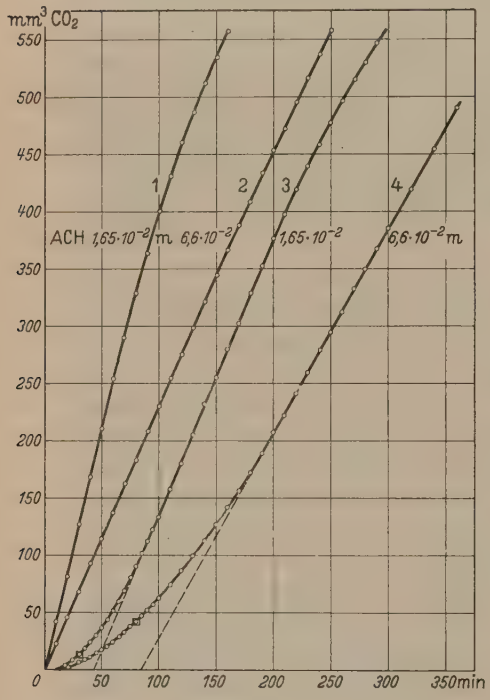


Abb. 1.

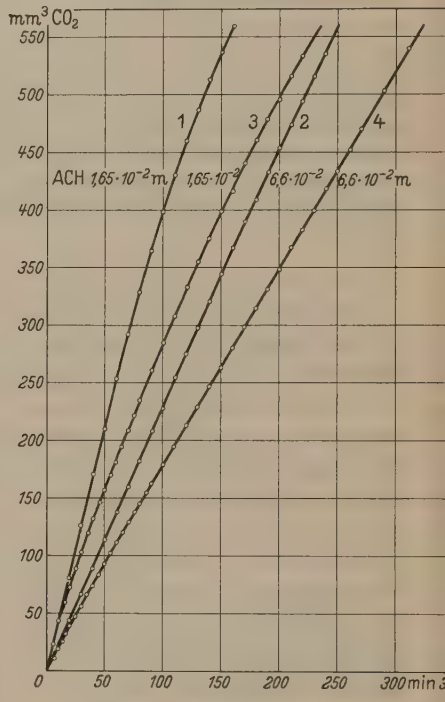


Abb. 2.

Abb. 1. Abhängigkeit der Prostigminhemmung von der Substratkonzentration nach vorheriger, 45 min dauernder Inkubation von Ferment und Hemmstoff. Das Gleichgewicht zwischen ChE und Prostigmin hat sich in dieser Zeit eingestellt. Kurven 1 und 2 Kontrollen: Erythrocyten + ACh. Kurven 3 und 4: (Erythrocyten + Prostigmin) + ACh. Prostigmin im Endansatz $2{,}16 \cdot 10^{-6}$ mol. ACh-Konzentrationen $1{,}65 \cdot 10^{-2}$ mol (Kurven 1 und 3) bzw. $6{,}6 \cdot 10^{-2}$ mol (Kurven 2 und 4) ⊡ = Punkte, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte der maximalen erreicht hat, bei Kurve 3 nach etwa 30 min, bei Kurve 4 nach etwa 80 min. Die gestrichelten Linien zeigen die Verlängerung des linearen Abschnitts der Reaktionsgeschwindigkeit der Kurven 3 und 4 nach unten. Sie dienen zur Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der ACh-Hydrolyse nach Beendigung der S-förmigen Krümmung der Spaltkurve.

Abb. 2. Abhängigkeit der Prostigminhemmung von der Substratkonzentration bei gleichzeitiger Zugabe von Hemmstoff und Substrat zum Ferment. Konzentrationen und Bezeichnungen der Kurven wie in Abb. 1. Ab etwa 200 mm³ CO_2 laufen die entsprechenden Kurven der Abb. 1 und 2 parallel, zeigen also die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse.

Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Konzentration an ungehemmten Fermentmolekülen ist, aus der Steilheit jedes Punktes der S-förmigen Kurve berechnen, wieviel ChE, auch wieder relativ gesehen, zu einer bestimmten Zeit enthemmt worden ist. Wir nehmen nun als Maß der Geschwindigkeit der Enthemmung den Punkt der Kurve, bei dem die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte der maximalen erreicht

hat. Vergleichen wir die Zeiten für diese Punkte für verschiedene Substratkonzentrationen, so sehen wir, daß die Enthemmung um so länger dauert, je höher die Substratkonzentration ist. Bei einfacher Betrachtung der beiden Kurven fällt diese Tatsache sofort auf. Dieser Befund steht nun im direkten Widerspruch zu der bisherigen Ansicht, daß die Abnahme der Hemmung auf Grund einer Verdrängung des Prostigmins durch ACh verursacht wird. Die Verdrängung müßte nach dem Massenwirkungsgesetz um so schneller verlaufen, je höher die Substratkonzentration ist. Da das nicht der Fall ist, muß ein anderer Mechanismus vorliegen. Nach früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe (Maier und Bammer[21]) und aus Literaturberichten wissen wir, daß die Hemmung von Prostigmin (und anderen ChE-Hemmstoffen) durch Cholin, das Spaltprodukt des ACh, vermindert bzw. aufgehoben wird.

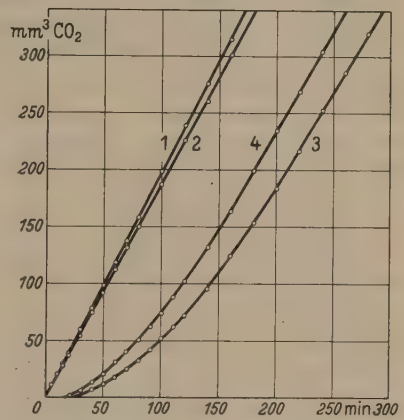


Abb. 3. Die Beeinflussung der Prostigminhemmung durch Cholin. Konzentrationen im Endansatz für ACh $8{,}3 \cdot 10^{-2}$ mol, für Prostigmin $1{,}0 \cdot 10^{-6}$ mol und für Cholin $2{,}1 \cdot 10^{-2}$ mol. Kurve 1: Erythrocyten + ACh. Kurve 2: Erythrocyten + (ACh + Cholin). Kurve 3: (Erythrocyten + Prostigmin) + ACh. Kurve 4: (Erythrocyten + Prostigmin) + (ACh + Cholin). Es ist ersichtlich, daß die Enthemmung bei Zusatz von Cholin (Kurve 4) schneller verläuft als ohne Cholin (Kurve 3).

Wir müssen nun daran denken, daß die Enthemmung der ChE auch durch das bei der Hydrolyse frei werdende Cholin erfolgen kann. In Abb. 3 geben wir einen Versuch wieder, der diese Frage prüft. Wir wählen eine möglichst hohe Substratkonzentration, bei der die ACh-Menge in dem Bereich der Spaltung, der uns interessiert, nicht merklich abnimmt, die Kontrollkurve verläuft bis etwa 400 mm^3 CO_2-Bildung praktisch linear. Die Cholinkonzentration nehmen wir relativ klein (1/40 der von ACh), so daß die Hemmung durch Cholin nicht merklich ins Gewicht fällt. Sie beträgt in diesem Beispiel 2,7% (Kurve 1 und 2). Kurve 3 stellt den Spaltverlauf unter Prostigmin dar, den wir aus Abb. 1 schon kennen. Im Ansatz 4 ist dem Substrat noch die kleine Cholinmenge zugesetzt. Die Abnahme der Hemmung erfolgt hier bedeutend schneller als ohne Cholin. Z. B. sind im Ansatz 3 nach 80 min 32 mm^3 CO_2 entwickelt, im Ansatz 4 dagegen 51. Nehmen wir noch höhere Cholinkonzentrationen, so wird, wie wir in anderen Versuchen feststellten, die Enthemmung weiter beschleunigt. Denken wir nun daran, daß die Aufhebung der Prostigminhemmung durch das Substrat ACh selber gehemmt wird, durch Cholin, das selber die ACh-Hydrolyse hemmt, dagegen beschleunigt wird, so folgt der zwingende Schluß, daß die Enthemmung nur durch

Cholin erfolgen kann. Wir können natürlich nicht mit Sicherheit ausschließen, daß auch ACh im gewissen Ausmaß an der Enthemmung beteiligt ist, der Einfluß von ACh ist aber jedenfalls sehr viel geringer als der von Cholin. Ein weiterer Versuch, den wir in Abb. 4 wiedergeben, soll unsere Ansicht stützen.

Wir haben aus der Abb. 2 gesehen, daß, wenn das Substrat und Prostigmin gleichzeitig zum Ferment gegeben werden, die Hemmung fortlaufend zunimmt, bis ein konstanter Wert erreicht wird. Der Verlauf gilt aber nur für die in jenem Versuch angewandte Hemmstoff-Konzentration. In Abb. 4 sehen wir jetzt die Reaktion bei einer höheren Prostigmin-Konzentration. Die Hemmung nimmt in den ersten Minuten zu, erreicht einen bestimten Wert und nimmt dann, wenn auch wesentlich langsamer, wieder ab. Dieser Kurvenverlauf kann ebenfalls nicht unter der Annahme interpretiert werden, daß es sich hier um die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Hemmstoff und Substrat am Ferment handelt. Eine Abnahme der Hemmung, d. h. eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, dürfte in den späteren Stadien nicht auftreten, denn wie sollte sich ein einmal eingestelltes Gleichgewicht zugunsten eines Reaktanten verschieben, wenn seine Konzentration, wie in unserem Fall, fortlaufend abnimmt.

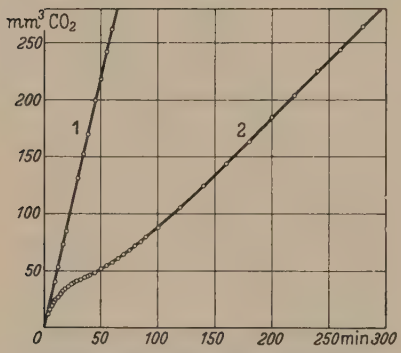


Abb. 4. Reaktionsablauf bei hoher Prostigminkonzentration ($1 \cdot 10^{-5}$ mol) und gleichzeitigem Zusatz von Hemmstoff und Substrat zum Ferment. ACh-Konzentration $1{,}65 \cdot 10^{-2}$ mol. Kurve 1: Erythrocyten + ACh (Kontrolle). Kurve 2: Erythrocyten + (Prostigmin + ACh).

Wir wissen, daß die Reaktion zwischen ChE und Prostigmin mit relativ langsamer Geschwindigkeit verläuft, sie ist im Falle der Serum-ChE für uns gut meßbar. Bei der Erythrocyten-ChE ist eine exakte Messung des Vorgangs aus methodischen Gründen nicht möglich, da hier Ferment und Hemmstoff bedeutend schneller miteinander reagieren. Nach unseren Beobachtungen hat sich das Gleichgewicht zwischen Erythrocyten-ChE und Prostigmin bei den von uns angewandten Konzentrationen nach 2—10 min annähernd eingestellt. Das Gleichgewicht zwischen Ferment und Substrat dagegen (wenn es ein solches überhaupt gibt) stellt sich wesentlich rascher ein. Wir sehen das aus unseren Kontrollversuchen ohne Hemmstoff, in denen sich die Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten Minuten nach Substratzusatz nicht verändert. Wie können wir nun den in Kurve 2 der Abb. 4 dargestellten Verlauf interpretieren? Eine uns im Augenblick einleuchtende Erklärung ist folgende:

Die Hydrolyse von ACh erfolgt sofort nach Zusatz der Substrat-Prostigminlösung. Die Anlagerung des Hemmstoffs verläuft dagegen mit langsamerer Geschwindigkeit. Anfangs ist die Geschwindigkeit der ACh-Hydrolyse größer als später, wo die ChE immer mehr durch das Prostigmin gehemmt wird. Andererseits wird in dieser Zeit fortlaufend Cholin freigesetzt, das, wie wir sahen, in den Reaktionsverlauf im Sinne einer Enthemmung eingreift. Seine Konzentration nimmt ständig zu, die Geschwindigkeit der *Ent*hemmung wird entsprechend größer. An dem Punkt unserer Kurve, an dem die Reaktionsgeschwindigkeit der ACh-Spaltung ihr Minimum aufweist, ist die Geschwindigkeit der Hemmung durch Prostigmin gleich der Geschwindigkeit der Enthemmung durch Cholin. Da nun aber weiter Cholin freigesetzt wird, nimmt die Geschwindigkeit der Enthemmung entsprechend zu. Die Konzentration an aktiven Fermentmolekülen steigt an, wodurch die Geschwindigkeit der ACh-Hydrolyse fortlaufend bis zu einem Maximum zunimmt.

Eine mathematische Analyse unserer Kurven ist, wie jedem verständlich sein wird, sehr schwierig, und es fragt sich, ob überhaupt eine explizite Funktion gefunden werden kann, die die verschiedenen Kurvenscharen einigermaßen befriedigend beschreibt. Wir bemühen uns zur Zeit, eine formale Lösung zu finden, da eine solche aus praktischen Gründen, z. B. für die Testung von Hemmstoffen der ChE notwendig ist. Wir geben aber, obwohl ein mathematisch-kinetischer Beweis für unsere Ansichten noch fehlt, unsere Befunde und die uns im Augenblick einleuchtende Interpretation wieder, da sie uns bei der Beurteilung der Wirkung der ChE-Hemmstoffe in vitro und in vivo wichtig erscheinen.

Unsere Befunde lassen sich in ihrer grundsätzlichen Natur nur unter folgender Annahme erklären. Die Hemmung der ChE durch Prostigmin ist nicht nur, wie bisher angenommen wurde, für das Substrat ACh kompetitiv, sondern auch nicht-kompetitiv. Sie besteht aus zwei verschiedenen Komponenten. Die nicht-kompetitive Hemmung wird durch Cholin aufgehoben. Es läßt sich zur Zeit noch nicht entscheiden, wie der Mechanismus der Enthemmung aufgefaßt werden muß. Möglicherweise besitzt Cholin ebenfalls eine Affinität zu der Gruppe des Fermentes, an die sich das Prostigmin in für das Substrat nicht-kompetitiver Weise anlagert, d. h. beide Substanzen würden an derselben Stelle konkurrieren. Wir müssen dabei voraussetzen, daß dann die Anlagerung von Cholin an dieser Stelle im Gegensatz zum Prostigmin nicht zu einer Inaktivierung des zugehörigen substratspaltenden Zentrums führt. Bezüglich der kompetitiven Hemmung schließen wir uns den Ansichten von Augustinsson und Nachmansohn[6] u. a. an. Wir erkennen sie aus der Hemmung der Spaltkurven, nachdem die S-förmige Krümmung der Kurve aufgehört hat und die Reaktionsgeschwindigkeit (bei genügend hoher Substrat-Konzentration) praktisch konstant geworden ist. Die Hemmung ist um so geringer, je höher die Substrat-Konzentration ist. Das Cholin kann auf diese Hemmung, im Gegensatz zu der ersten,

nichtkompetitiven, keinen Einfluß haben, da sie sich trotz dauernder Erhöhung der Cholin-Konzentration nicht verändert. Diese für ACh kompetitive Hemmung tritt erst in höheren Konzentrationen stärker in Erscheinung, bei unseren Substrat-Konzentrationen (um 10^{-2} mol) zwischen 10^{-6} und 10^{-5} mol Prostigmin, während die nicht-kompetitive schon bei 10^{-8} mol Prostigmin deutlich sichtbar wird. Ob diese beiden Hemmungsarten des Prostigmins grundsätzlich verschieden sind, wagen wir vorläufig noch nicht ganz sicher zu entscheiden. Ähnliche Erscheinungen kennen wir auch bei anderen Fermenten. So ist Jacobsen[17] bei Untersuchungen an Phosphatasen zu der Ansicht gekommen, daß anorganisches Phosphat sowohl ein kompetitiver als auch ein nicht-kompetitiver Hemmstoff ist. Die gleiche Eigenschaft müssen wir nach unseren Befunden dem Prostigmin zusprechen, welches sich sowohl in für das Substrat nicht-kompetitiver als auch in kompetitiver Weise mit dem Ferment vereinigen kann. Inwieweit sich in unseren Kurven diese beiden Hemmungen gegenseitig beeinflussen, ist nicht leicht zu entscheiden. Die zweite kompetitive Hemmung hat in unseren Ansätzen zweifellos eine Wirkung auf die erste, nicht-kompetitive. Dadurch, daß sie die Hydrolyse des ACh und damit die Freisetzung von Cholin hemmt, wird die Enthemmung durch Cholin verzögert.

Die Beeinflussung der Prostigminhemmung durch d-Tubocurarin und 3-Oxyphenyltrimethylammonium-bromid.

Es war nun naheliegend zu prüfen, ob die oben genannte Eigenschaft des Cholins, die Prostigminhemmung aufzuheben, auch für andere Substanzen zutrifft. Wir untersuchten zunächst den Antagonisten des Prostigmins in vivo, das d-Tubocurarin und weiter den Alkoholanteil im Prostigmin, das 3-Oxyphenyltrimethylammonium-bromid (OPTA), beide quartäre Ammoniumbasen wie ACh und Cholin. In den Abb. 5 und 6 ist der Spaltverlauf für bestimmte Konzentrationen dieser Substanzen wiedergegeben.

Wir haben auch hier selbstverständlich die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer variiert, das Grundsätzliche, auf das es uns ankommt, war aber überall das gleiche. Beide, sowohl d-Tubocurarin als auch OPTA, hemmen die Erythrocyten-ChE kompetitiv. Bei ihrer Anwesenheit tritt keine S-förmige Verkrümmung der Spaltkurve wie bei Prostigmin auf. Sie besitzen in diesem Punkt die gleichen Eigenschaften wie das Cholin. Aus den Abbildungen ist nun ersichtlich, daß sie im Gegensatz zum Cholin die Enthemmung der ChE nach Vergiftung mit Prostigmin nicht beschleunigen, sondern sogar verzögern (Kurven 4 in den Abb. 3, 5 und 6). Diese Verzögerung ist abhängig von der Konzentration an d-Tubocurarin und OPTA; sie ist um so stärker, je höher die Konzentration der beiden Substanzen ist, d. h. je höher auch die

eigentliche Hemmung der ACh-Hydrolyse ist. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu der Wirkung von Cholin. Die Erscheinung erklären wir so, daß durch die Hemmung der ACh-Hydrolyse und damit langsameren Cholinfreisetzung die Cholinenthemmung der durch Prostigmin vergifteten ChE verzögert wird. Den gleichen Mechanismus müssen wir im übrigen auch für den Befund postulieren, daß die Enthemmung der ChE bei höheren Substratkonzentrationen langsamer verläuft. Auch hier wird die ChE (durch das ACh) gehemmt und damit die Bildung von Cholin verzögert. Die Möglichkeit, daß die Reaktionen komplizierter sind,

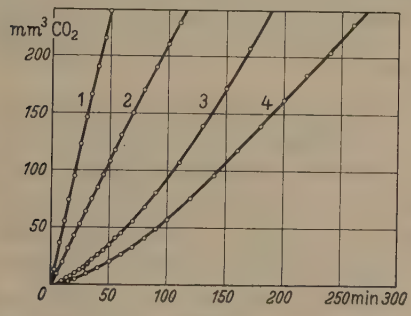


Abb. 5.

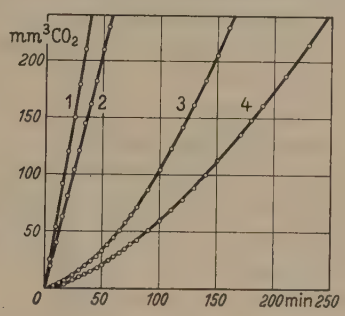


Abb. 6.

Abb. 5. Die Beeinflussung der Prostigminhemmung durch d-Tubocurarin. Im Endansatz 1,65 $\cdot 10^{-2}$ mol ACh, $5 \cdot 10^{-6}$ mol Prostigmin und $2 \cdot 10^{-4}$ mol d-Tubocurarinchloridpentahydrat. Kurve 1: Erythrocyten + ACh (Kontrolle). Kurve 2: Erythrocyten + (ACh + d-Tubocurarin). Kurve 3: (Erythrocyten + Prostigmin) + ACh. Kurve 4: (Erythrocyten + Prostigmin) + (ACh + d-Tubocurarin). Die Enthemmung verläuft bei Anwesenheit von d-Tubocurarin (Kurve 4) im Gegensatz zu Cholin langsamer als ohne d-Tubocurarin (Kurve 3).

Abb. 6. Die Beeinflussung der Prostigminhemmung durch 3-Oxyphenyltrimethylammoniumbromid (OPTA). ACh- und Prostigminkonzentrationen wie in Abb. 5. OPTA-Konzentration im Endansatz $2 \cdot 10^{-5}$ mol. Kurve 1: Erythrocyten + ACh (Kontrolle). Kurve 2: Erythrocyten + (ACh + OPTA). Kurve 3: (Erythrocyten + Prostigmin) + ACh. Kurve 4: (Erythrocyten + Prostigmin) + (ACh + OPTA). Auch hier verläuft die Enthemmung bei Anwesenheit von OPTA (Kurve 4) (wie bei d-Tubocurarin) langsamer als ohne OPTA (Kurve 3).

daß z. B. ACh die Enthemmung auch direkt und nicht nur indirekt hemmt, können wir zur Zeit nicht ausschließen. Eine Klärung kann erst durch weitere Versuche oder durch die mathematische Analyse erreicht werden.

Besprechung der Ergebnisse.

Wir haben im Vorstehenden dargelegt, daß die Prostigminhemmung der Erythrocyten-ChE aus zwei verschiedenen Komponenten besteht, einer für das Substrat nicht-kompetitiven, die sich schon bei niedrigeren Hemmstoff-Konzentrationen manifestiert, und einer zweiten kompetitiven, die erst bei höheren Prostigminmengen nachweisbar ist. Nach den uns vorliegenden Literaturberichten gilt dieses zweifellos auch für andere Cholinesterasen. Wir können jetzt die Frage aufwerfen, ob und inwieweit mit diesen Befunden die pharmakologischen Wirkungen von Prostigmin und ähnlichen ChE-Hemmstoffen besser verstanden werden können.

Bekanntlich ist in den vergangenen Jahren eine umfangreiche Literatur über ChE-hemmende Stoffe entstanden, und es hat nicht an Versuchen gefehlt, die Wirkung dieser Substanzen mit ihrer ChE-hemmenden Eigenschaft in Verbindung zu bringen, zum großen Teil mit recht negativem Ergebnis. Auch bei den starken ChE-Hemmstoffen, wie Eserin, Prostigmin und den Alkylphosphaten stehen noch verschiedene Fragen offen. Die Potenzierung der ACh-Wirkung durch kleinere Dosen dieser Substanzen findet eine befriedigende Erklärung in ihrer ChE-hemmenden Eigenschaft. Unklarheiten bestehen aber noch über den Mechanismus der Hemmung der ACh-Wirkung durch höhere Konzentrationen, wobei erhebliche Unterschiede in dem Verhältnis der fördernden und hemmenden Dosis bei verschiedenen, sonst qualitativ gleichartig wirkenden Stoffen auftraten; letzteres läßt sich mit der Annahme nur sehr unzureichend erklären, daß die Hemmung der ACh-Wirkung bei höheren Dosen durch einen ACh-Block infolge maximaler ChE-Hemmung zustande kommt. Wir wollen nun an Hand einer einfachen Modellvorstellung versuchen, eine Erklärung dafür zu geben.

Von Clark[8] wurde zuerst die Möglichkeit erwogen, daß sich das ACh an seinen Wirkungsorten als eine Art Co-Ferment an einen spezifischen Receptor anlagert. Die Anlagerung soll als lockere und reversible chemische Bindung erfolgen. Die Receptor-ACh-Verbindung soll dann die Reaktionen auslösen, die zu der für uns sichtbaren ACh-Wirkung führen. Diese Ansicht wird zur Zeit von verschiedenen namhaften Forschern geteilt (siehe z. B. Koelle und Gilman[19]). Nehmen wir zunächst zur Vereinfachung an, daß die Strukturen des Receptors der ACh-Wirkung und das aktive Zentrum der ChE, an dem das Substrat gespalten wird, gleich oder zumindest sehr ähnlich seien. Wir benutzen also die ChE als Modell für den Receptor der ACh-Wirkung im Gewebe. In diesem Fall würde ACh die gleiche Affinität zu beiden besitzen. Dem ACh chemisch verwandte Substanzen, wie z. B. quartäre Ammoniumbasen, müßten danach ebenfalls eine Affinität zu beiden Receptoren aufweisen. Die Wirkung von d-Tubocurarin läßt sich auf dieser Grundlage erklären. Durch eine Bindung an den Zellreceptor der ACh-Wirkung verhindert es die Anlagerung von ACh, ACh selber wird zwar freigesetzt (in der motorischen Endplatte z. B.), die Bildung des wirksamen ACh-Receptor-Komplexes wird aber verhindert. Da die Bindung zwischen Zellreceptor und d-Tubocurarin eine lockere und reversible ist, ebenso wie bei ACh, verhalten sich beide kompetitiv. Durch eine Erhöhung der ACh-Konzentration in der Nähe von mit d-Tubocurarin belegten Receptoren (durch Zufuhr von ACh von außen oder durch Hemmung der ChE) kann das Curare verdrängt werden, und die ACh-Wirkung tritt wieder auf. Die gleichen Erscheinungen sehen wir an der ChE, wo sich auf Grund der kinetischen Untersuchungen ergab, daß d-Tubocurarin vermutlich mit derselben Haftgruppe reagiert wie das Substrat.

Betrachten wir nun die starken Hemmstoffe der ChE, wie in unserem Falle das Prostigmin. Nach der bisherigen Meinung soll es sich bei diesem um einen ausschließlich kompetitiven Inhibitor der ChE handeln.

Das Prostigmin müßte sich danach an dieselbe Gruppe der ChE anlagern wie ACh. Dasselbe müßten wir genau so wie bei d-Tubocurarin auch für den Zellreceptor des ACh fordern. Prostigmin müßte demnach auch die ACh-Wirkung selber hemmen, d. h. curareartig wirken. Bei niedrigen Konzentrationen ist das aber nicht der Fall, wir stellten vielmehr eine Verstärkung und Stabilisierung der ACh-Wirkung und einen Antagonismus zur Wirkung von Curare fest. Nehmen wir jetzt unsere Interpretation der Prostigminhemmung als Basis für unsere Betrachtungen. Bei niedrigen Prostigminkonzentrationen ist die Hemmung der ChE fast ausschließlich nicht-kompetitiv. Die Hemmung der ChE erfolgt nicht dadurch, daß das Prostigmin das ACh von der substratspaltenden Gruppe der ChE verdrängt, sondern auf andere Weise. Entsprechend kann das Prostigmin bei diesen Konzentrationen auch nicht wesentlich die Receptoren der ACh-Wirkung belegen. Seine Wirkung erfolgt nur dadurch, daß es die ChE hemmt, damit die Konzentration an ACh erhöht und dessen Wirkung verstärkt. Wir sahen weiter, daß bei höheren Prostigminkonzentrationen neben der nicht-kompetitiven auch eine kompetitive Hemmung auftritt; das Prostigmin beginnt hier in Konkurrenz mit dem ACh an dessen Haftgruppe im ChE-Molekül zu treten. Wir müssen nun entsprechend unserer Arbeitshypothese fordern, daß bei diesen Konzentrationen auch eine Anlagerung des Prostigmins an den Receptor der ACh-Wirkung selber erfolgt und damit die ACh-Wirkung vermindert bzw. aufgehoben wird. Das ist nun tatsächlich der Fall.

In zahlreichen Arbeiten wurde immer wieder übereinstimmend berichtet, daß Prostigmin bzw. Physostigmin, bei dem die qualitativen Verhältnisse im allgemeinen gleich sind, in höheren Konzentrationen die ACh-Wirkung hemmen; sie wirken ausgesprochen curareartig. In der Arbeit von Eccles und MacFarlane[10] sind die konzentrationsabhängigen Wirkungen von Prostigmin und verschiedenen anderen ChE-Hemmstoffen auf dem Endplattenstrom des curarisierten Froschsartorius sehr schön zu sehen. Bei niedrigen Hemmstoffkonzentrationen wird der Endplattenstrom verstärkt, mittlere haben keine Wirkung, in höheren Konzentrationen wird der Endplattenstrom in gleicher Weise wie durch d-Tubocurarin gehemmt. Gleichzeitig sind mit unserer Ansicht auch die großen quantitativen Unterschiede zwischen der fördernden und hemmenden Dosis bei den sieben von ihnen getesteten ChE-Hemmstoffen zu erklären. Wir müssen nämlich vermuten, daß, falls unsere Annahme über zwei getrennte Hemmungsarten der ChE durch Prostigmin zutrifft, die Dissoziationskonstanten der beiden Hemmungen bei den verschiedenen, qualitativ gleichartig wirkenden ChE-Hemmstoffen nicht im gleichen Verhältnis zueinander stehen. Nehmen wir z. B. an, daß zwei Prostigminderivate gleich große Affinitätskonstanten für die nicht-kompetitive Hemmung besitzen und daß die Konstanten für die kompetitive Hemmung bei der ersten Verbindung 10mal kleiner, bei der zweiten dagegen 100mal kleiner wären, so würden beide Substanzen bei gleichen Konzentrationen am gleichen Testobjekt die ACh-Wirkung maximal fördern; eine Hemmung der ACh-Wirkung würde bei der ersten Verbindung schon bei einer etwa 10fach stärkeren Konzentration auftreten, bei der zweiten dagegen erst bei einer 100fach stärkeren.

Eine weitere Arbeit neueren Datums, die wir in diesem Zusammenhang erwähnen wollen, ist die von Koppanyi und Karczmar[20]. Die Verff. berichteten über die Potenzierung der ganglionären ACh-Wirkung durch verschiedene ChE-Hemmstoffe und stellten ebenfalls bei höheren Dosen eine Blockierung des ACh-Effektes fest. Auch hier wurden bei den einzelnen Stoffen erhebliche Unterschiede in dem Verhältnis zwischen fördernder und hemmender Dosis festgestellt. Es ist unsere Aufgabe, die Affinitätskonstanten der beiden Hemmungen festzustellen und zu sehen, ob sich mit den in vivo-Versuchen eine Übereinstimmung ergibt.

Selbstverständlich sind die Verhältnisse im Organismus wesentlich komplizierter, als sie hier angenommen wurden; so sind zweifellos substratspaltendes Zentrum der ChE und Zellreceptor der ACh-Wirkung in ihrer Struktur verschieden. Es ist aber wahrscheinlich, daß beide gewisse chemische und physikalische Eigenschaften gemeinsam aufweisen, die z. B. eine mehr oder minder stark ausgeprägte Affinität zu quartären Ammoniumbasen bedingen. Unsere Hypothese scheint uns im Augenblick, natürlich mit den notwendigen Einschränkungen versehen, die Curarewirkung von Prostigmin und ähnlichen Substanzen einigermaßen befriedigend zu erklären. Eine endgültige Theorie setzt allerdings voraus, daß wir den Wirkungsmechanismus von ACh genau kennen. Wir sind leider heute noch weit entfernt davon.

Wir sahen weiter, daß die Stärke der nicht-kompetitiven Hemmung durch Prostigmin von der im Reaktionsgemisch vorhandenen Cholinkonzentration abhängig ist. Es wäre zu prüfen, ob die unterschiedlichen Wirkungen von Prostigmin in den einzelnen Organen möglicherweise von der dort herrschenden aktuellen Cholinkonzentration abhängen. So wäre es möglich, daß in einem Organ, in dem die Cholinkonzentration groß ist, Prostigmin in einer bestimmten Dosis noch keine ChE-Hemmung und damit noch keine Wirkung zeitigt, während in einem anderen Organ bei derselben Prostigmin-, aber einer geringeren Cholinkonzentration schon eine beträchtliche Inaktivierung der ChE auftritt und sich damit die Prostigminwirkung manifestiert.

Dazu ergibt sich aus unseren Versuchen, daß die Affinität von Prostigmin zur ChE wesentlich größer sein muß, als bisher im allgemeinen angenommen wurde. Die nicht-kompetitive Hemmung tritt schon bei sehr kleinen Konzentrationen auf. Bei $1 \cdot 10^{-8}$ mol Prostigmin sahen wir in den ersten Minuten bei höheren Substratkonzentrationen, bei denen die Enthemmung langsam verläuft, noch eine 100%ige Hemmung. Eine Dissoziationskonstante für den nicht-kompetitiven Anteil der Prostigminhemmung können wir zur Zeit aus unseren Ansätzen nicht berechnen. Die Dissoziationskonstante, die Eadie[9] für den Serum-ChE-Prostigminkomplex auf $2 \cdot 10^{-14}$ berechnete, scheint uns etwas zu niedrig zu sein. Vermutlich liegt der wahre Wert für die Erythrocyten-ChE zwischen 10^{-9} und 10^{-11}. Wir müssen dabei noch bedenken, daß in unseren Ansätzen schon bei Beginn der Reaktion, also

beim Mischen von Substrat und dem Ferment-Prostigmin-Gemisch, eine im Vergleich zur Prostigminkonzentration schon sehr hohe Cholinkonzentration vorhanden ist. Sie liegt schätzungsweise bei 10^{-4} mol. In diesem Fall (Prostigmin $1 \cdot 10^{-8}$ mol) ist sie also schon 10^4mal größer als die Prostigminkonzentration. Ihre Größe ist bedingt durch die Selbsthydrolyse des ACh, die in der Zeit zwischen dem Lösen des Substrats und dem Versuchsbeginn auftritt, außerdem enthält die ACh-Trockensubstanz vermutlich auch noch geringe Mengen an Cholin. Für die Ablesungen am Manometer kann nach unseren Versuchen die Selbsthydrolyse des ACh vernachlässigt werden. Für die Versuche mit kleinen Prostigminkonzentrationen muß sie aber berücksichtigt werden, denn wir hatten ja gesehen, daß die nicht-kompetitive Prostigminhemmung durch Cholin aufgehoben wird. So haben wir in verschiedenen Versuchen festgestellt, daß die Enthemmung in unseren Ansätzen (Ferment + Prostigmin) + ACh um so rascher verlief, je älter die ACh-Lösung war, wobei schon bei einem Unterschied von nur 1 Std deutliche Differenzen auftraten. Es ist daher wahrscheinlich, daß Prostigmin die ChE in einem cholinfreien Reaktionsgemisch schon in weit kleineren Konzentrationen als $1 \cdot 10^{-8}$ mol völlig hemmt, nur können wir dieses mit unserer Methodik nicht mehr erfassen. Wir werden aber darauf aufmerksam gemacht, daß für alle Versuche mit Prostigmin und anderen ähnlich hemmenden Substanzen nur ganz frische ACh-Lösungen verwendet werden dürfen, und daß Vergleichsuntersuchungen zwischen verschiedenen Hemmstoffen nur gleichzeitig und mit der gleichen Substratlösung angesetzt werden dürfen!

Unsere Untersuchungen, die wir zunächst mit Prostigmin durchführten, müssen in gleicher Weise auf die anderen wirksamen ChE-Hemmstoffe ausgedehnt werden. Wir nehmen fast sicher an, daß die qualitativen Verhältnisse bei Physostigmin die gleichen wie bei Prostigmin sind. Bei den Alkylphosphaten, wie DFP, TEPP, Parathion usw. können wir es vermuten. (Bei einer Reihe von Prostigminderivaten haben wir es bereits nachgewiesen.) Wir haben vor, auch diese Substanzen in der von uns eingeschlagenen Richtung zu prüfen. Falls unsere Vermutung zutrifft, ergibt sich die Möglichkeit, den in vivo wirksamen ChE-Hemmstoffen eine definierte Eigenschaft in vitro zuzuweisen, nämlich die, daß sie die ChE für ACh nicht kompetitiv hemmen, die Hemmung aber durch Cholin aufgehoben wird.

Die Inaktivierung der ChE durch Alkylphosphate wurde bisher als irreversibel angesehen. Durch den neuesten Bericht von Wilson[30] aus der Schule von Nachmansohn wird diese Ansicht erschüttert. Es konnte nämlich durch Tetraäthylpyrophosphat völlig inaktivierte ChE durch Cholin reaktiviert werden, wenn auch die Enthemmung relativ langsam (über Tage) dauerte. Es ist zu vermuten, daß zwischen den sogenannten reversiblen Hemmstoffen wie Prostigmin und den „irreversiblen" (Alkylphosphate) nur der Unterschied besteht, daß die Enthemmung durch Cholin bei den ersteren schnell, bei den letzteren wesentlich

langsamer verläuft. Daß die Enthemmung der prostigminvergifteten ChE durch eine gegebene Cholinmenge eine meßbare Zeit benötigt, sie also nicht unendlich schnell erfolgt, konnten wir in unseren Versuchen bereits feststellen. Wir werden später darauf zurückkommen.

Bemerkenswert finden wir die Tatsache, daß zwischen der Wirkung von Cholin einerseits und der von d-Tubocurarin und 3-Oxyphenyltrimethylammonium andererseits am Ferment ein Unterschied besteht. Alle drei Substanzen zeigen, wenn ihre Wirkung auf die ACh-Hydrolyse selbst untersucht wird, auf Grund unserer augenblicklichen Befunde keine qualitativen Unterschiede. Die nicht-kompetitive Prostigminhemmung aber wird nur von Cholin aufgehoben. Die beiden anderen Substanzen zeigen diese Wirkung nicht bzw. in unseren Versuchen nicht deutlich. Wenn eine solche bei ihnen vorliegen sollte, was auf Grund einiger Versuche für 3-Oxyphenyltrimethylammonium möglich sein kann, so ist sie jedoch weitaus geringer als bei Cholin. Es erscheint uns daher zur Zeit unwahrscheinlich, daß die Enthemmung der prostigminvergifteten ChE durch Cholin und dessen kompetitive Hemmung der ACh-Hydrolyse auf ein und demselben Mechanismus beruhen. Das Cholin muß daher auch Wirkungen auf das Ferment ausüben, die uns bisher unbekannt waren. Es wird unsere Aufgabe sein, weitere Substanzen zu testen, um nähere Einblicke in den Mechanismus zu gewinnen. Der Befund von Wilson[30], daß die Reaktivierung von ChE, die durch Tetraäthylpyrophosphat gehemmt war, durch Hydroxylamin noch schneller erfolgt als durch Cholin, fordert in dieser Hinsicht besondere Beachtung. Weitere Hinweise in dieser Richtung geben die Arbeiten von Koelle[18] und Augustinsson[5].

Zum Schluß noch einige kritische Bemerkungen zur Messung der ChE-Hemmung durch Prostigmin und ähnlich wirkende Substanzen. Bislang wurde die Auswertung so vorgenommen, daß eine bestimmte Zeit nach dem Substratzusatz die gespaltene Menge an Substrat festgestellt wurde und daraus die Aktivität bzw. die Hemmung berechnet wurde. Vorausgesetzt wurde dabei aber, daß die Reaktion in dem beobachteten Abschnitt praktisch linear verläuft. Dies ist nun nach unseren Versuchen mit Prostigmin nicht der Fall. Es liegt nicht nur *eine* zeitbestimmende Reaktion von der 0. oder I. Ordnung vor, sondern es handelt sich um komplizierte Simultanreaktionen, von denen mehrere gleichzeitig zeitbestimmend sind und die die Substratspaltung gesetzmäßig beeinflussen. Die Erforschung und mathematische Behandlung dieser Reaktionsabläufe setzt voraus, daß die Spaltung des Substrats in jedem einzelnen Ansatz möglichst bis zur Nachperiode der Reaktion verfolgt wird und der Spaltverlauf durch genügend häufige Analysen genau festgelegt wird. Ein Vorgehen, das sich bei der manometrischen Methode sehr leicht und ohne großen Arbeitsaufwand durchführen läßt. Es scheint uns daher die von Schaefer[27] zuerst vorgeschlagene fortlaufende Messung der Substratspaltung in jedem einzelnen Ansatz für diesen Fall die einzig richtige zu sein. Es ist damit vermutlich möglich, die verschiedenen Diskrepanzen in der Literatur aufzuklären. Es ist auch zu hoffen, daß verschiedene neuere Untersuchungen, wie z. B. die von Myers[24, 25], über die Differenzierung sogenannter „kompetitiver" ChE-Hemmstoffe und Arbeiten aus der Schule von Nachmansohn[31] unter den in dieser Arbeit festgelegten Gesichtspunkten noch einmal durchgeführt werden.

Zusammenfassung.

Die Hemmung der menschlichen Erythrocyten-Cholinesterase durch Prostigmin wurde untersucht.

1. Es werden Befunde angegeben, die die Ansicht stützen, daß die Prostigminhemmung aus zwei verschiedenen Komponenten besteht, nämlich aus einer für das Substrat Acetylcholin nicht-kompetitiven und einer kompetitiven Hemmung.

2. Die nicht-kompetitive Hemmung wird durch das während der Spaltung entstehende Cholin aufgehoben. Dadurch wird die Tatsache erklärt, daß die Hemmung des prostigminvergifteten Fermentes nach Zusatz des Substrates mit der Zeit fortlaufend abnimmt.

3. Im Gegensatz zu Cholin verzögern d-Tubocurarin und 3-Oxyphenyltrimethylammonium die Enthemmung. Es besteht demnach zwischen der Wirkung von Cholin einerseits und der Wirkung von d-Tubocurarin und 3-Oxyphenyltrimethylammonium andererseits ein deutlicher Unterschied.

4. Es wird eine Hypothese entwickelt, die die Hemmung der ACh-Wirkung in vivo durch höhere Prostigminkonzentrationen zu erklären versucht. Die Cholinesterase wird dabei als Modell für den Zellreceptor der ACh-Wirkung benutzt.

Literatur.

[1] Aldridge, W. N.: Biochemic. Journ. **46**, 451 (1950). — [2] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1933). — [3] Augustinsson, K.-B.: Acta physiol. scand. **15**, Suppl. 52 (1948). — [4] Augustinsson, K.-B.: Acta chem. scand. **5**, 699 (1951). — [5] Augustinsson, K.-B.: Acta chem. scand. **5**, 712 (1951). — [6] Augustinsson, K.-B., and D. Nachmansohn: J. of Biol. Chem. **179**, 543 (1949). — [7] Augustinsson, K.-B., and D. Nachmansohn: Science (Lancaster, Pa.) **110**, 98 (1949). — [8] Clark, A. J.: Hdb. d. exper. Pharmakol., Erg. Werk 4. Bd. (1937). — [9] Eadie, G. S.: J. of Biol. Chem. **146**, 85 (1942). — [10] Eccles, J. C., u. W. V. MacFarlane: J. Neurophysiol. **12**, 59 (1949). — [11] Goldstein, A.: J. Gen. Physiol. **27**, 529 (1944). — [12] Goldstein, A.: Biol. Bull. **95**, 275 (1948). — [13] Goldstein, A.: Fed. Proc. **7**, 93 (1948). — [14] Goldstein, A., O. Krayer, M. A. Root, G. H. Acheson and M. E. Doherty: J. of Pharmacol. **96**, 56 (1949). — [15] Haldane, J. B. S., u. K. G. Stern: Allgemeine Chemie der Enzyme. Dresden u. Leipzig 1932. — [16] Hardegg, W., u. H. Schaefer: Pflügers Arch. (im Druck). — [17] Jacobsen, E.: Biochem. Z. **249**, 21 (1932); **267**, 89 (1933). — [18] Koelle, G. B.: J. of Pharmacol. **88**, 232 (1946). — [19] Koelle, G. B., and A. Gilman: Pharmacol. Rev. **1**, 166 (1949). — [20] Koppanyi, Th., and A. G. Karczmar: J. of Pharmacol. **101**, 327 (1951). — [21] Maier, E. H., u. H. Bammer: Biochem. Z. **322**, 85 (1951). — [22] Mendel, B., and H. Rudney: Biochemic. J. **37**, 59 (1943). — [23] Michaelis, L., u. L. M. Menten: Biochem. Z. **49**, 333 (1913). — [24] Myers, D. K.: Arch. Biochem. **27**, 341 (1950). — [25] Myers, D. K.: Arch. Biochem. **31**, 29 (1951). — [26] Roepke, M. H.: J. of Pharmacol. **59**, 264 (1937). — [27] Schaefer, H.: Pflügers Arch. **249**, 405 (1947). — [28] Strauss, O. H., and A. Goldstein: J. Gen. Physiol. **26**, 559 (1943). — [29] Wescoe, W. C., W. F. Riker jr. and V. L. Beach: J. of Pharmacol. **99**, 265 (1950). — [32] Wilson, I. B.: J. of Biol. Chem. **190**, 111 (1951). — [31] Wilson, I. B., and F. Bergmann: J. of Biol. Chem. **185**, 479 (1950).

Dr. Wolfgang Hardegg, Heidelberg, Physiolog. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 556—561 (1952).

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. Seitz).

Der Einfluß von Laevulose auf die Methylalkoholvergiftung bei Ratten.

Von
K. Stuhlfauth, H. Neumaier und G. Bommes.

(Eingegangen am 6. Februar 1952.)

Mit Hilfe von Laevulose kann der Abbau des Äthylalkohols im Körper beschleunigt werden (Gremels, Stuhlfauth und Neumaier). Auf diese Weise läßt sich bei schweren Äthylalkoholintoxikationen eine Entgiftung erreichen. Es lag daher nahe, diese günstige Wirkung des Fruchtzuckers auch bei der viel toxischeren Methylalkoholvergiftung zu erproben. Orientierende Versuche ließen jedoch einen gegenteiligen Effekt bei der Methanolvergiftung vermuten, so daß in einer vorläufigen Mitteilung (Stuhlfauth und Neumaier) vor Analogieschlüssen von der günstigen Laevulosewirkung beim Äthanolabbau auf ähnliche Wirkungen beim Methanolabbau gewarnt werden mußte.

Zur Klärung dieser wichtigen Frage führten wir Methanolvergiftungen mit und ohne Laevulosegaben bei Ratten durch. Dabei wurden mit Hilfe einer Metallknopfsonde Methylalkohol und Laevulose direkt in den Magen eingebracht, eine Prozedur, welche die Tiere im allgemeinen gut vertrugen. Als tödliche Dosis ermittelten wir bei Vorversuchen die Menge von 10—12 cm^3 Methanol/kg Körpergewicht. Für die anschließenden größeren Versuchsreihen wurden 8 cm^3 Methylalkohol/kg als subletale Standarddosis gewählt, die deutliche klinische Vergiftungserscheinungen erzeugte, aber nur in Ausnahmefällen zum Tode führte.

28 Ratten erhielten Methylalkohol ohne Laevulose. 26 weiteren Tieren wurde 2 Std nach der Methylalkoholdarreichung, d. h. nach sicherer Beendigung der Resorption, Laevulose in einer Menge von durchschnittlich 1,2 g/kg zugeführt. Von den an der Vergiftung verstorbenen oder nach bestimmten zeitlichen Abständen getöteten Retten wurden Leber und Gehirn histologisch untersucht. Die Leber erschien nach den Literaturberichten als der beste Indicator für das Ausmaß der Giftwirkung. Im Gehirn bemühten wir uns — ohne Erfolg —, die von Orthner beschriebenen, für Methylalkoholvergiftung spezifischen bilateralen Nekrosen in den lateralen Putamenabschnitten zu finden.

Die Versuche erbrachten insgesamt folgende Ergebnisse: Einmalige Zufuhr der Standarddosis von 8 cm^3 Methylalkohol/kg wurde fast ausnahmslos überlebt. Im Anschluß an die Sondierung boten die Ratten etwa 12 Std lang das Bild eines schweren Intoxikationszustandes. Nach etwa 24 Std erschienen sie wieder wesentlich frischer und unterschieden

sich am zweiten Tag nach der Vergiftung kaum mehr von gesunden Tieren. Eine zweite, gleich große Methanolgabe nach 24 Std führte jedoch meist zum Tode, da der Methylalkohol bei Ratten ebenso wie bei Menschen erheblich langsamer abgebaut wird als Äthylalkohol und somit länger im Blut kreist.

Verabreichte man 2 Std nach der Methylalkoholgabe Laevulose, so starb ein Drittel der Tiere spontan nach 15—30 Std. Auch die übrigen erweckten den Eindruck eines schwereren Vergiftungszustandes, als das nach alleiniger Methylalkoholdarreichung der Fall war.

Am ausgeprägtesten traten die Unterschiede jedoch histologisch an den Leberschnitten in Erscheinung. Die Veränderungen wurden an Hämatoxylin-Eosin- und an Sudanfärbungen studiert. Im HE-Präparat fielen vor allem Parenchymschäden leichtesten bis schwersten Grades auf: Trübe Schwellung, scholliger Zerfall, tropfige Entmischung des Parenchymzell-Protoplasmas. Daneben bestanden Kernschäden, wie sie dem Bild der Nekrobiose entsprechen: Pyknose, Chromatolyse und Karyorrhexis bis zum Verdämmern und völligen Verschwinden der Kernstrukturen. In Fällen stärkeren Parenchymschadens kam es zu Parenchymzelldissoziation und zur Lösung der Zellen aus dem Verband des Balkennetzes, meist in den zentralen Läppchenabschnitten. Die Kupfferschen Sternzellen waren aktiviert und teilweise abgelöst. Ein toxisches Ödem, wie es Orthner fast regelmäßig an der Leber Methylalkoholvergifteter fand, trat bei den Versuchen an Ratten nicht auf. Durchweg war venöse und kapilläre Hyperämie vorhanden.

Die Sudanschnitte ließen alle Stadien der Verfettung beobachten: Als erstes Zeichen der Schädigung Fettspeicherung in den Kupfferschen Zellen, dann fein- bis mittel- bis großtropfige Verfettung der Parenchymzellen, meist der zentralen Läppchenabschnitte, aber auch diffuse Verfettung des gesamten Parenchyms.

Um die histologischen Ergebnisse statistisch besser auswerten zu können, wurde das Ausmaß der Verfettung in 4 Grade eingeteilt. Danach entspricht

Grad I (= Verfettung geringen Grades) einer überwiegend feintropfigen, locker im Zellprotoplasma verteilten Fetteinlagerung in den Parenchymzellen.

Grad II (= Verfettung mäßigen Grades) einer ebensolchen, teils aber auch mitteltropfigen Fetteinlagerung.

Grad III (= Verfettung mittleren Grades) einer die Zellen teilweise ganz ausfüllenden fein- bis mittel- bis großtropfigen Fetteinlagerung.

Grad IV (= Verfettung stärkeren Grades) einer massiven fein- bis mittel- bis großtropfigen Fetteinlagerung mit völliger Ausfüllung des Parenchymzell-Protoplasmas.

Die untenstehende Tabelle gibt Aufschluß über das Ausmaß der histologisch darstellbaren Leberverfettung:

a) Nach Methylalkohol ohne Laevulose:

I. Grad	17 Ratten	17 mal	I. Grad = 17
II. Grad	7 Ratten	7 mal	II. Grad = 14
III. Grad	4 Ratten	4 mal	III. Grad = 12
IV. Grad	—	—	IV. Grad = —
			43

b) Nach Methylalkohol + Laevulose:

I. Grad	3 Ratten	3 mal	I. Grad = 3
II. Grad	11 Ratten	11 mal	II. Grad = 22
III. Grad	6 Ratten	6 mal	III. Grad = 18
IV. Grad	6 Ratten	6 mal	IV. Grad = 24
			67

Während bei der ersten Gruppe die überwiegende Zahl der Ratten nur Verfettung I. Grades aufwies und damit das für Stalltiere physiologische Maß der Verfettung kaum überschritt, verschoben sich die Werte bei der zweiten Gruppe zugunsten der stärkeren Vergiftungsgrade. Multipliziert man die Zahl der Ratten mit der jeweils beobachteten Verfettungsstufe und addiert die Werte, so ergibt sich bei der ersten Gruppe eine Summe von 43 (bei 28 Ratten), bei der zweiten dagegen eine solche von 67 (bei 26 Ratten). Das Schema bezieht sich lediglich auf die Verfettung, da die in der HE-Färbung erkennbaren Strukturveränderungen an Plasma und Kern nicht in gleicher Weise gradmäßig eingeteilt werden können. Doch erweist auch die HE-Färbung eine beträchtliche Steigerung der Zellschäden nach Gaben von Methylalkohol + Laevulose.

Die Gehirne wurden nach Formolfixierung sowohl mit der Präparierlupe als auch histologisch gründlich untersucht. Veränderungen analog den Putamennekrosen beim Menschen ließen sich jedoch *nicht* finden.

Während bei der Äthylalkoholvergiftung Laevulosezugabe klinisch eine Entgiftung bewirkte, trat bei der Methylalkoholintoxikation eine Steigerung der Giftwirkung durch Laevulose und damit ein völlig entgegengesetzter Effekt ein. Um das erklären zu können, muß man den Mechanismus der Methylalkoholintoxikation ebenso wie die spezifische Laevulosewirkung berücksichtigen.

Die Umsetzung von Methanol erfolgt beim Menschen 5—10mal langsamer als jene von Äthanol. Von amerikanischer Seite (Bartlett) durchgeführte Rattenversuche mit Methylalkohol, der radioaktiven Kohlenstoff enthielt, ergaben einen Umsatz von 25 mg Methylalkohol/kg/Std. Der entsprechende Wert für Äthylalkohol beträgt 175 mg/kg/Std, was einem 7mal so raschen Abbau entspricht.

Nach der Regel von Richardson über die Wirkung einwertiger, gesättigter, primärer Alkohole nimmt deren Giftigkeit mit steigender Zahl der C-Atome im Verhältnis $1 : 3 : 3^2 : 3^3$ usw. zu. Das Ausmaß der Giftigkeit bezieht sich dabei ausschließlich auf das Alkoholmolekül. Tatsächlich ist Methanol als Alkohol weit harmloser als Äthanol und die anderen Produkte der homologen Reihe. Die Giftigkeit des Methylalkohols ist ausschließlich in seinen Abbauprodukten zu suchen. Dafür spricht die Tatsache, daß auch bei tödlich verlaufenden Vergiftungen beim Menschen der eigentliche Rauschzustand als Ausdruck der primären Alkoholwirkung gering ausgeprägt sein kann. Die typische Latenzzeit zwischen Aufnahme des Methylalkohols und Einsetzen der Vergiftungserscheinungen weist ebenfalls darauf hin, daß die giftigen Substanzen erst allmählich gebildet werden.

Als solche kommen die Produkte des oxydativen Methanolabbaues, Formaldehyd und Ameisensäure in Frage. Diese werden als unphysiologische Substanzen nicht oder weniger rasch verbrannt als die entsprechenden Verbrennungsprodukte von Äthanol (Acetaldehyd und Essigsäure) und verweilen bis zu ihrer Ausscheidung länger im Körper. Der in vivo schwer nachweisbare Formaldehyd ist ein spezifisches Zellgift und führt durch Methylenierung von Aminosäuren zur Bildung von „Methyleneiweißkörpern" (Orthner). Während bei exogener Formaldehydeinwirkung die oberflächliche Eiweißfällung ein tieferes Eindringen verhindert, kommt es beim endogenen Entstehen des Formaldehyds gewissermaßen zu einer allmählichen Vergiftung der Zellen von innen heraus.

Über die Giftigkeit der Ameisensäure besteht keine einheitliche Auffassung. Auf jeden Fall führt sie neben anderen Substanzen eine beträchtliche Acidose im vergifteten Organismus herbei. Dieser acidotischen Stoffwechsellage ist nach Keeney ein beträchtlicher Teil der aus der Vergiftung erwachsenden Schäden zuzuschreiben. Mit dieser Ansicht stimmt überein, daß kräftige Alkalisierung das Vergiftungsbild erheblich abzuschwächen vermag. Insgesamt jedoch kann die hohe Toxizität von Methanol durch diese in jeweils geringer Konzentration auftretenden Produkte des oxydativen Abbaues allein schwerlich erklärt werden.

Nach Dunker und Halbach und vielen anderen Autoren wird Fructose im Organismus besonders rasch verbrannt. Es kommt dabei zu vermehrter Bildung von Brenztraubensäure und Milchsäure als den physiologischen Abbauprodukten im KH-Stoffwechsel. Gleichzeitig erfolgt ein vorübergehender Abfall des anorganischen Phosphats, das offenbar für die Phosphorylierung in Beschlag genommen wird (Pletscher, Fahrländer und Staub, Stuhlfauth und Prosiegel).

Beim Abbau von Äthanol erfolgt zunächst Oxydation zu Acetaldehyd, dieser wird durch Oxydation in Essigsäure umgewandelt, die ihrerseits zu CO_2 und H_2O verbrennt. Am langsamsten geht dabei die Oxydation zu Acetaldehyd vonstatten. Diese erste Stufe des Äthanolabbaues läuft in der Weise ab, daß die Oxydation des Äthylalkohols zu Acetaldehyd gekoppelt ist mit einer Reduktion der in der Leber entstehenden Brenztraubensäure zu Milchsäure. Wie Westerfield, Stotz und Berg mitteilten, läßt sich eine beschleunigte Senkung des Blutalkoholspiegels nach Äthanoleinnahme durch Zufuhr von Brenztraubensäure erreichen. Der langsame Ablauf innerhalb dieser ersten Stufe des Äthanolabbaues scheint demnach seine Ursache darin zu haben, daß der Körper die für die gekoppelten Reaktionen nötige Brenztraubensäure nicht in genügenden Mengen entwickelt. Durch exogen zugeführte Brenztraubensäure oder zusätzliche Brenztraubensäure-Entwicklung aus Laevulose kann der Äthanolabbau erheblich beschleunigt werden.

In analoger Weise dürfte bei Zufuhr von Laevulose nach Methylalkoholdarreichung der Abbau des Methanols rascher vonstatten gehen als ohne Laevulosezugabe. Im Zusammenhang mit der durch Laevulose

herbeigeführten Beschleunigung der dissimilatorischen Prozesse im KH-Stoffwechsel kommt es zur Entwicklung größerer Mengen von Intermediärprodukten (nicht nur Brenztraubensäure) (Stuhlfauth), die wahrscheinlich auch in den Methanolabbau beschleunigend eingreifen. Welches Intermediärprodukt hierfür in erster Linie in Frage kommt, bedarf noch weiterer Klärung.

Beim Äthylalkohol liegt die Giftwirkung im Alkoholmolekül selbst begründet, während seine Abbauprodukte harmlos sind. Eine beschleunigte Bildung dieser Abbauprodukte bedeutet daher Entgiftung. Im Gegensatz dazu ist beim Methanol das Alkoholmolekül selbst weniger schädlich als die Abbauprodukte. Da Laevulose die Giftwirkung von Methanol nur quantitativ steigert, das Vergiftungsbild aber nicht qualitativ verändert, darf man annehmen, daß in Analogie zur Laevulosewirkung auf den Äthanolabbau auch bei der Methanolvergiftung durch Laevulosezugabe eine Beschleunigung des Abbaues zu den giftigen Stoffwechselendprodukten zustande kommt. Die bei Methylalkohol bestehende azidotische Stoffwechsellage mit ihren schädlichen Wirkungen auf den Organismus dürfte überdies durch die Verstärkung der Azidose bei der Dissimilation der Laevulose gesteigert werden.

Wie oben dargelegt, läßt die günstige Wirkung von Laevulose bei Äthylalkoholvergiftung eine therapeutische Anwendung indiziert erscheinen. Im Gegensatz dazu ist gemäß den oben besprochenen Erfahrungen bei der Methylalkoholvergiftung der Versuch einer Laevulosetherapie strengstens abzulehnen. Handelt es sich um Mischformen von Äthyl- und Methylalkoholvergiftung, wie dies in der Praxis bisweilen vorkommt, so ist zwar mit günstigem Einfluß der Laevulose auf die Äthylalkoholkomponente, andererseits jedoch mit Verstärkung der Giftwirkung des Methylalkohols zu rechnen. Somit sollte auch in zweifelhaften Fällen eine Laevulosezufuhr unterbleiben.

Zusammenfassung.

Ausgehend von der Erfahrung, daß der Abbau von Äthylalkohol im Körper durch Laevulose beschleunigt wird, untersuchten wir die Wirkung von Laevulose auf den Methylalkoholabbau bei Ratten. 28 Ratten erhielten Methylalkohol, 26 weitere Tiere Methylalkohol und Laevulose. Als Kriterien der Giftwirkung dienten klinischer Intoxikationszustand, Zahl der spontanen Todesfälle und histologisches Bild der Leber in HE- und Fettfärbung. Dabei ergab sich eindeutig eine Steigerung der Giftwirkung durch Zugabe von Laevulose. Histologische Veränderungen im Gehirn, wie sie bei der menschlichen Methylalkoholvergiftung häufig gefunden werden, waren nicht nachzuweisen.

Laevulose beschleunigt verschiedene Stoffwechselvorgänge, so auch den Abbau von Alkoholen. Während dies beim Äthylalkohol klinisch

Entgiftung bedeutet, führt raschere Bildung der Abbauprodukte des Methanols, Formaldehyd und Ameisensäure, zu einer beträchtlichen Verschlimmerung des Vergiftungsbildes, da nicht das Methanol selbst, sondern seine Abbauprodukte für die Giftwirkung verantwortlich sind. Von therapeutischer Anwendung der Laevulose bei Methanolvergiftung ist dringend abzuraten.

Literatur.

Bartlett, G. R.: Amer. J. of Physiol. **163**, 614 (1950). — Dunker, E., u. H. Halbach: Z. klin. Med. **148**, 477 (1949). — Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 57 (1948). — Keeney, A. H., and S. M. Mellinkoff: Ann. Int. Med. **34**, 2 (1951). — Orthner, H.: Die Methylalkoholvergiftung. Springer 1950. — Pletscher, A., H. Fahrländer et H. Staub: Helvet. Physiol. Acta **9**, 46 (1951). — Stuhlfauth, K., u. H. Neumaier: Med. Klin. **46**, 20 (1951); **22**, 46 (1951). — Stuhlfauth, K., u. R. Prosiegel: Klin. Wschr. **1952** (im Druck). — Westerfield, W., E. Stotz and R. Berg: J. of Biol. Chem. **144**, 657 (1942).

[Dozent Dr. K. Stuhlfauth, München, Med. Poliklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 214, S. 562—578 (1952).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)
und dem Physiologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. G. Schubert).

Quecksilberwirkung und osmotische Diurese beim Hund.

Von
G. Giebisch, H. Klupp und S. Rapoport.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Dezember 1951.)

Seit den Experimenten von Govaerts[1] und Bartram[2] ist bekannt, daß die Quecksilberdiuretika ihre Wirkung hauptsächlich an der Niere selbst entfalten. Diese renale Wirkung besteht unter anderem in einer Steigerung der Natrium- und Chloridausscheidung[3] sowie in einer wechselnden Erhöhung des Harnvolumens. Denselben Befund erhob Gremels[4] am isolierten Herz-Lungen-Nierenpräparat. Die genaue Lokalisation des Angriffspunktes der Wirkung von Quecksilberverbindungen innerhalb der Niere konnte jedoch bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden: so vertreten Mudge et al.[5] die Ansicht, daß unter Quecksilbereinwirkung die Natrium- und Wasserrückresorption in den proximalen Tubulusanteilen verringert wird. Pitts und Duggan[6] dagegen glauben auf Grund ihrer Experimente auf einen Angriffspunkt der Quecksilberpräparate im distalen Tubulus schließen zu können.

Untersuchungen an hydropenischen Hunden[7] haben gezeigt, daß bei osmotischer Diurese die Harnbereitung in zumindest zwei voneinander unabhängigen Stufen vor sich geht: der am weitesten distale Prozeß besteht in Rückresorption von Wasser allein, während augenscheinlich proximal von dieser Stelle alle anderen Rückresorptions- und Sekretionsprozesse stattfinden. Da die osmotische Diurese somit gestattet, quantitativ zu unterscheiden, in welchem Ausmaße sich Einflüsse verschiedenster Art[8] auf die beiden eben erwähnten Prozesse auswirken, bietet diese Versuchsanordnung eine Möglichkeit, den Wirkungsort der Quecksilberdiuretika näher zu lokalisieren.

Die osmotische Diurese durch Mannit ist, wie später ausführlich gezeigt werden soll, in besonderem Maße geeignet, Einflüsse auf die Funktion des proximalen Tubulus aufzudecken; Beladungen mit Natriumchlorid in verschieden großen Mengen sollten erweisen, inwieweit der Quecksilbereffekt von dem Ausmaß der Salzbeladung abhängig ist. Ob dagegen eine Erhöhung der Chloridausscheidung unabhängig von einer gleichzeitigen Zunahme der Natriumausscheidung erfolgen kann, sollten

Versuche mit Natriumferrocyanidbeladung zeigen: die starke Verminderung der Chloridkonzentration des Harnes bei Anwesenheit von Ferrocyanid muß einen isolierten chloruretischen Effekt besonders deutlich hervortreten lassen.

Ferner wurde untersucht, ob unter unseren Versuchsbedingungen der Zusatz von Theophyllin einen maßgeblichen Einfluß auf die Wirkung der Quecksilberdiuretika hat.

Methodik.

Die Versuche wurden an 8 weiblichen Hunden im Gewicht zwischen 16,5 und 22 kg durchgeführt. In 9 von den insgesamt 15 Diureseversuchen wurden die Tiere mit 0,4 cm³/kg 10%iger Pernoctonlösung (intravenös verabreicht) narkotisiert; die übrigen Versuche erfolgten an wachen, trainierten Tieren, die in liegender Stellung am Versuchstisch lose befestigt waren. Um die Hunde in hydropenischen Zustand zu versetzen, wurde nach einer Fütterung mit Maiskuchen und Trockenfleischpulver 20 Std vor dem Versuch jegliche Flüssigkeits- und Nahrungszufuhr eingestellt. Zu Versuchsbeginn wurde die Harnblase der Tiere entleert und zur Bestimmung der Ausgangsdiurese der Harn durch zwei Perioden von 15—20 min Dauer gesammelt. Die Harngewinnung erfolgte durch einen Plastikkatheter, der während des Versuches in der Blase belassen wurde. Das Einführen des Katheters an den wachen Tieren wurde durch vorherige operative Freilegung der Urethraöffnung (Perineotomie) erleichtert. Eine in die Fußvene eingeführte und in situ belassene Kanüle ermöglichte die Abnahme der Blutproben während der gesamten Versuchsdauer. Die Kanüle wurde nach jeder Blutentnahme mit verdünnter Heparinlösung durchspült und verschlossen.

Zur Erzeugung der osmotischen Diurese verwendeten wir Mannit, Natriumchlorid und Natriumferrocyanid. Diese Substanzen verteilen sich bei intravenöser Injektion im Körper in einer Flüssigkeitsmenge von etwa 20% des Körpergewichtes. Zur Erzielung eines entsprechenden Plasmaspiegels wurden in den Beladungsversuchen mit Mannit in der Einstellinfusion (priming infusion) Mengen von 40 bis 50 Milliosmol* (mOsm) pro Kilogramm ($7 \cdot 2 - 9{,}1$ g/kg) von dieser Substanz injiziert. Die Einstellinfusion dauerte bei allen Versuchen je nach der verabreichten Flüssigkeitsmenge 5—10 min. Bei den Versuchen mit Natriumchlorid wurde durch Beladungen mit 8,5—50,0 mOsm/kg ($0{,}25 - 1 \cdot 46$ g/kg) osmotische Diurese verschiedenen Ausmaßes erzielt. Zur Beladung mit Natriumferrocyanid betrug die in der Einstellinfusion zugeführte Menge 9 mOsm/kg (0,885 g/kg). Entsprechend der Größe der Ausscheidung wurde in den Versuchen mit allen drei Beladungssubstanzen zur Erhaltung eines konstanten Plasmaspiegels pro Minute 1,0—1,3% der in der Einstellinfusion enthaltenen Menge für die gesamte Dauer des Versuches als Erhaltungsinfusion zugeführt. Dafür eignete sich in besonderem Maße eine einfach regulierbare Motorspritze (System Heuwing). Alle zugeführten Lösungen waren gegenüber dem Harn hyperton; die verabreichten Flüssigkeitsmengen betrugen je nach den Versuchsbedingungen 0,7—3,0 cm³ pro Minute.

Die Bestimmung des Glomerulusfiltrates erfolgte in allen Versuchen mit Inulin**. Von dieser Substanz wurden entsprechend ihrem Verteilungsvolumen in

---

*1 Osmol $= \frac{1 \text{ g Mol}}{\text{Zahl der Teilchen bei vollständiger Dissoziation eines Moleküls}}$

** Inulin wurde uns pyrogenfrei von der Fa. Frank & Freudl (Linz a. d. D.) in dankenswerter Weise überlassen.

20% des Körpergewichtes zur Erzielung eines Blutspiegels von etwa 30 mg% Mengen von 60 mg/kg Inulin der Einstellinfusion zugesetzt. Die Erhaltungsinfusion enthielt 1% dieser Menge.

Die Harnsammelperioden begannen in allen Versuchen 30 min nach Beendigung der Einstellinfusion und dauerten 10 oder 15 min. Die Blutentnahme erfolgte in Abständen von 30 min.

Die Bestimmung von Inulin in Plasma und Harn erfolgte auf colorimetrischem Wege nach den Angaben von Roe und Epstein[9]. Chloride wurden durch Fällung mit Silbernitrat in einer von van Slyke[10] angegebenen Modifikation der Volhardschen Methode bestimmt. Da durch Silbernitrat auch Natriumferrocyanid gefällt wird, war es in Versuchen mit dieser Substanz notwendig, vor der Chloridfällung das Ferrocyanid-Ion zu entfernen: im Harn gelingt dies leicht durch Mischen von gleichen Teilen Harn und 10%iger Zinksulfatlösung. Das dabei ausgefällte Zinkferrocyanid wird abfiltriert. Die im Blut vorhandene geringe Menge von Natriumferrocyanid wurde bei der Chloridbestimmung vernachlässigt. Natrium wurde nach der Methode von Barber und Kolthoff[11] durch Uranylzinkacetat ausgefällt und gravimetrisch bestimmt. Der osmotische Druck des Harnes wurde durch Bestimmung des Gefrierpunktes mittels Beckmann-Thermometers ermittelt. Die entsprechende osmotische Konzentration errechnet sich aus der Gefrierpunktserniedrigung $\triangle$ nach der Formel

$$\text{Osm}/L = \frac{\triangle}{1{,}86},$$

wobei 1,86 die molare Gefrierpunktserniedrigung angibt. Als Quecksilberpräparat verwendeten wir „Injection of Mersalyl“ (Savory und Moor) und theophyllinfreies Salyrgan (Höchst)*. Die verabreichte Dosis beider Präparate entsprach in allen Versuchen 60 mg Quecksilber und wurde i.v. injiziert. Diese Dosis wurde deshalb gewählt, weil nach Pitts und Duggan[6] eine Erhöhung der Quecksilberdosis über diesen Wert hinaus keine weitere Steigerung des Quecksilbereffektes bewirkt.

Ergebnisse.

Versuche mit Mannit.

Die Wirkung von Quecksilberdiuretika ist aus Tab. 1 sowie aus Abb. 1 zu ersehen. Die Tabelle enthält Daten über den zeitlichen Ablauf des Versuches, über Harnmenge und Inulinclearance und über die Konzentrationen von Natrium und Chorid in Plasma und Harn. Ferner sind die pro Minute ausgeschiedenen Mengen dieser Ionen, die osmotische Aktivität und die Gesamtmenge des im Harn enthaltenen osmotischen Gutes (osmotic load) angegeben sowie die Ausscheidung an Natrium und Chlorid, berechnet als Prozent der im Glomerulusfiltrat vorhandenen Menge.

Der Tab. 1 ist zu entnehmen, daß sich bei diesem Versuch die Harnmenge nach Quecksilberverabreichung nur wenig ändert, während sie in anderen Versuchen, wie z. B. Abb. 1 zeigt, auf fast das Doppelte ansteigt. Die Inulinclearance ist in beiden Fällen kaum verändert. Die Chlorid-

* Theophyllinfreies Salyrgan wurde uns von den Farbwerken Höchst in dankenswerter Weise überlassen.

Tabelle 1.

Periode NO.	Zeit Minuten	Harn Volum. cm³/min	Clearance Inulin cm³/min	Chloride Plasma mOsm/L	Chloride Harn mOsm/L	Chloride Ausscheidg. % Glom. Filt.	Natrium Plasma mOsm/L	Natrium Harn mOsm/L	Natrium Ausscheid. % Filt.	Harn Osmolarität mOsm/L	Harn OSM-Gut. mOsm/min
0	—36—16	0,33		115,0	199,0			160,0		1800	595
Hund: Toto, 19,5 kg; Einstellinfusion: 57,0 cm³ Mannit 25%, Erhaltungsinf. 1%											
1	41— 61	3,02	62,3	115,0	83,0	4,9	164,0	72,6	2,8	785	2370
2	61— 71	2,51	55,0	119,0	82,0	3,0				823	2060
72: i.v. Injektion von 162 mg theophyllinfreiem Salyrgan (60 mg Hg)											
3	71— 86	2,60	56,0		71,0			66,5		824	2140
4	86—107	2,22	49,6	118,5	68,0	3,1				823	1825
5	107—122	2,46	52,9		88,0					790	1942
117: Abbruch der Infusion											
6	122—137	2,15	49,5	122,0	111,0	4,0		105,5		775	1750
7	137—152	2,26	46,5		151,0		172	116,0	3,5	757	1710
8	152—167	2,48	45,5		186,0			150,0		730	1650

konzentration im Harn dagegen, und wie die Tabelle zeigt, auch die Natriumkonzentration, steigen auf ein Vielfaches des Ausgangswertes. Sie erreichen in den beiden hier wiedergegebenen Versuchen Werte von über 180 mOsm/L. Die Gesamtmenge von ausgeschiedenem Natrium und Chlorid erhöht sich entsprechend der Volumen- und Konzentrations-

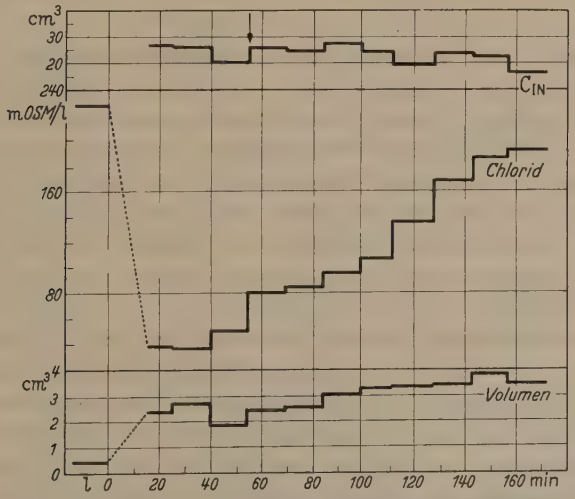


Abb. 1. Hund Luxi, 16,5 kg. Beladung mit 0,725 g/kg Mannit (= 4,0 mOsm/kg). Abscisse: Zeit in Minuten. Zur Zeit 0: Ende der Einstellinfusion. Bei L sind die Harnmenge und die Chloridkonzentration vor Beginn der Infusion angegeben. Ordinaten: Obere Kurve: Inulinclearance in cm³ pro Minute. Mittlere Kurve: Chloridkonzentration in mOsm/L. Untere Kurve: Harnmenge in cm³/min. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Injektion von 1,5 cm³ Mersalyl (= 60 mg Hg) an.

änderung, wobei jedoch die ausgeschiedene Menge auch während der Quecksilberwirkung nie 5% der im Glomerulus filtrierten übersteigt. Der Anteil von Natrium und Chlorid an der Gesamtosmolarität des Harnes, der bei unseren Mannitversuchen oft äußerst gering war, stieg unter dem Einfluß von Quecksilber bis auf 60%. Das Gleichbleiben der Harnmenge in dem Versuch der Tab. 1 (Versuchstier Toto) wurde durch den Abbruch der Erhaltungsinfusion verursacht: bei fallender Mannitdiurese wird die Abnahme des Harnflusses durch die diuretische Wirkung von Salyrgan kompensiert. Die so entstandene Konstanz des Harnvolumens ermöglicht eine besonders klare Darstellung der saluretischen Wirkung von Quecksilber.

Eine weitere Beobachtung, die wir bei allen unseren Versuchen machen konnten, ist ebenfalls in dem Versuch der Tabelle deutlich zu erkennen: im Verlaufe der Quecksilberwirkung nimmt die osmotische Konzentration des Harnes bedeutend ab, obwohl die Harnmenge gleich bleibt. Ein Vergleich der Harnsammelperioden 2 und 8 zeigt z. B. einen Abfall um 93 mOsm/L. Ferner zeigen alle Versuche mit Mannitbeladung einen charakteristischen zeitlichen Ablauf der Quecksilberwirkung: die Zunahme der Ausscheidung von Salz und Wasser setzt langsam ein, erreicht erst nach etwa 100 min ihren Höhepunkt und klingt dann allmählich wieder ab (Abb. 1). Der wesentliche Effekt des Quecksilbers besteht somit in einer bedeutenden Steigerung der *Salurese*, die mit einer Erhöhung der Natrium- und Chloridkonzentration im Harn einhergeht.

Versuche mit Natriumchlorid.

Tab. 2 und Abb. 2 beschreiben 2 Diureseversuche mit verschiedener Natriumchlorid-Beladung. Aus der Tabelle, die das Protokoll eines Versuches mit hoher Beladung wiedergibt, ist zu ersehen, daß der Harnfluß schon vor der Quecksilberverabreichung infolge der zugeführten großen Kochsalzmengen eine Höhe von fast 9 cm^3/min erreicht. Bereits in der der Injektion des Hg-Präparates folgenden Harnsammelperiode kommt es zu einer weiteren Steigerung der Diurese. 25—70 min danach erreicht die Harnmenge ein Maximum von fast 15 cm^3/min und sinkt dann stetig ab. Die Inulinclearance bleibt von der 2. bis zur vorletzten Periode im wesentlichen konstant. Zum Zeitpunkt der 1. Harnsammelperiode scheint sich das Verteilungsgleichgewicht für Inulin noch nicht eingestellt zu haben, so daß der entsprechende Clearancewert etwas zu hoch liegt. Das Absinken der Clearancewerte in der letzten Periode und vielleicht auch schon in der vorletzten kann wohl durch den verschlechterten hämodynamischen Zustand des Tieres und den progressiven Wasserverlust bei gleichzeitiger hoher Salzbelastung erklärt werden: die Plasmawerte für Natrium und Chlorid, die bei dem in Tab. 2 wiedergegebenen Versuch eine Zunahme bis zu 40 mOsm/L erfahren, lassen die

Tabelle 2.

Periode NO.	Zeit Minuten	Harn Volum. cm³/min	Clearance Inulin cm³/min	Chloride Plasma mOsm/L	Chloride Harn mOsm/L	Chloride Ausscheidg. % Filtr.	Natrium Plasma mOsm/L	Natrium Harn mOsm/L	Natrium Ausscheid. % Filtr.	Harn Osmolarität mOsm/L	Harn OSM-Gut. mOsm/L
0	—21—1	0,34		110	119		155			1562	538
	Hund: Lizzi, 16,5 kg; Einstellinfusion: 196 cm³ NaCl 10% von —23—0										
1	33— 43	8,85	73		260					683	6040
2	43— 53	8,82	51	161	270	29,0	199	275	24,0	650	5730
	55: 1,50 cm³ Mersalyl i.v. (60 mg Hg)										
3	53— 63	9,90	63		271					710	7040
4	63— 78	12,30	51		258					683	8410
5	78— 93	14,90	52	168	245	41,0		264	35,5	575	8560
6	93—108	14,80	58		242					596	8810
7	108—123	14,50	58,5	168	245	36,6	199	253	31,0	575	8350
8	123—138	13,30	55,5		244					570	7570
9	138—153	12,60	53,9	175	240	32,5	211		28,5	612	7710
10	153—163	11,0	49,0	174	248	32,0	206	255	27,6	607	6660

hohe Natriumchloridbelastung erkennen. Die Konzentrationen von Natrium und Chlorid im Harn zeigen auch nach der Quecksilberinjektion nur Änderungen von geringem Ausmaß, lassen aber doch ein systematisches Absinken bei Zunahme der Harnmenge erkennen. Die Gesamtausscheidung dieser beiden Ionen steigt beträchtlich an, so daß von der im Glomerulus filtrierten Menge bis zu 40% des Chlorids und 35% des

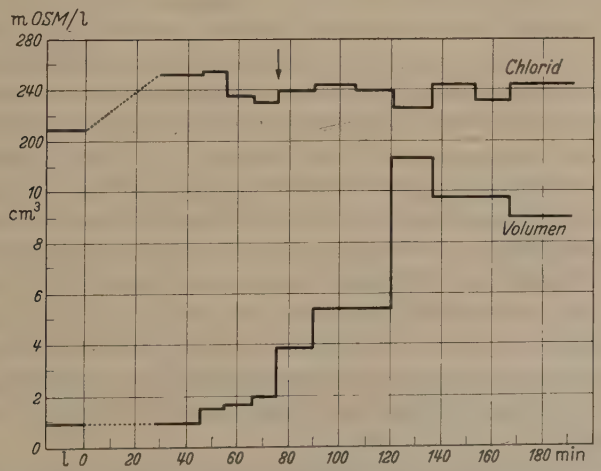


Abb. 2. Hund Max, 22 kg. Beladung mit 0,25 g/kg NaCl (= 8,5 mOsm/kg). Abscisse: Zeit in Minuten, beginnend vom Ende der Einstellinfusion. Bei L: Harnmenge und Chloridkonzentration vor Beginn der Einstellinfusion. Ordinaten: Obere Kurve: Chloridkonzentration in mOsm/L. Untere Kurve: Harnmenge in cm³ pro Minute.

Natriums im Harn aufscheinen. Die Harnosmolarität zeigt den für die osmotische Diurese charakteristischen Abfall bei Erhöhung der Harnmenge. Doch ist auch bei Natriumchloridbeladung auffallend, daß nach Quecksilbereinwirkung die osmotische Konzentration bei fallender Harnmenge nur geringe Tendenz zum Wiederanstieg aufweist. Die Gesamtmenge des osmotischen Gutes erreicht die gewaltigen Werte von fast 9000 mOsm/min. Andere Versuche mit noch höheren Salzbeladungen, die mit dem Leben kaum mehr vereinbar waren, ergaben im wesentlichen gleiche Resultate.

Bei Beladungen mit kleinen Natriumchloridmengen zeigen sich nach Quecksilberverabreichung quantitative Unterschiede gegenüber den soeben besprochenen Versuchen mit hoher Salzbeladung: in Abb. 2 ist ein derartiger Versuch wiedergegeben. Auch hier ist die Wirkung des Quecksilberdiuretikums bereits nach wenigen Minuten zu sehen und erreicht ihr Maximum schon nach 1 Std. Die Wirkung ist jedoch relativ und absolut bedeutend stärker als bei hoher Salzbeladung; in dem hier abgebildeten Versuch steigt die Harnmenge von 2 cm^3 auf über 11 cm^3/min. Somit ergibt sich, daß auch bei den Versuchen mit Natriumchloridbeladung die Wirkung des Quecksilbers *primär auf einer Steigerung der Salurese* beruht. Sie ist von einer Erhöhung des Harnvolumens begleitet, wobei jedoch die Harnkonzentration an Natrium und Chlorid keine Steigerung, sondern eher einen Abfall erfährt.

Versuche mit Ferrocyanid.

Das Protokoll eines Versuches mit osmotischer Diurese durch Ferrocyanid ist in Tab. 3 wiedergegeben: im Harn ist die für diese Substanz charakteristische Dissoziation der Natrium- und Chloridausscheidung festzustellen; einer relativ hohen Harnkonzentration von Natrium steht eine äußerst geringe Chloridkonzentration gegenüber. Die Plasmanatriumkonzentration an Natrium ist dabei um etwa 30 mOsm/L erhöht. Im Gegensatz zu den früher geschilderten Versuchen betrifft die Wirkung von Quecksilber bei Natriumferrocyanidbeladung die Natrium- und Chloridausscheidung nicht in gleichem Ausmaß: während sich die Natriumkonzentration im Harn nur wenig ändert, steigt die Chloridkonzentration bei mäßiger Zunahme der Harnmenge deutlich an.

Es verhält sich also die Quecksilberwirkung auf die Natriumionen im Falle der Ferrocyaniddiurese ähnlich wie bei der Natriumchloridbeladung; der Effekt auf die Chloridausscheidung entspricht jenem bei Mannitdiurese.

In allen Versuchen unterschied sich theophyllinfreies Salyrgan in keiner Weise von dem käuflichen xanthinhaltigen Handelspräparat Mersalyl.

Tabelle 3.

Periode NO.	Zeit Minuten	Harn Volum. cm³/min	Clearance Inulin cm³/min	Chloride Plasma mOsm/L	Chloride Harn mOsm/L	Chloride Ausscheidg. % Filtr.	Natrium Plasma mOsm/L	Natrium Harn mOsm/L	Natrium Ausscheid. % Filtr.	Harn Osmolarität mOsm/L	Harn OSM-Gut. mOsm/L
0	— 20—0	0,35			169		156			1900	665
	Hund: Rex, 24,0 kg; Narkose: 0,4 g/kg Pernocton 10%										
	Einstellinfusion: 140 cm³ 15% $Na_4Fe(CN)_6$, Erhaltungsinfusion: 2,0 cc/min										
1	15— 25	6,3	45,0		30,0					543	3100
2	25— 45	5,5	47,1	122,0	31,5	6,0	182	464	29,4	613	3360
3	45— 55	4,8	45,7		32,5					675	3250
4	55— 65	4,45	44,7		29,6					704	3140
	66: 1,6 cm³ Mersalyl (60 mg Hg) i. v.										
5	65— 80	5,55	52,0	121,0	58,5	8,5				669	3670
6	80— 95	6,25	52,0		59,0			470		603	3460
7	95—110	5,67	49,1	122,0	57,0	13,1				590	3350
8	110—125	5,11	46,0		58,5			467		603	3460
9	125—140	4,99	52,2	122,0	57,0	9,0	179			618	3080
10	140—155	5,40	55,5		53,0					590	3350
11	155—186	5,20	57,0	122,0	56,0	8,4				640	3320
12	186—201	4,55	57,0	123,0	54,0	6,5	183			650	2960

Diskussion.

West und Rapoport[7] fanden, daß die osmotische Diurese am hydropenischen Hund den für die Zwangsdiurese am Menschen gefundenen Gesetzmäßigkeiten unterliegt[12]; es besteht eine Beziehung zwischen der Harnmenge und der osmotischen Konzentration des Harnes. Bei steigendem Volumen nimmt die osmotische Konzentration, berechnet aus der Gefrierpunktserniedrigung, ab. Ferner steht das Harnvolumen in direktem Verhältnis zu der in der Zeiteinheit ausgeschiedenen Menge osmotischen Gutes: einer bestimmten pro Minute ausgeschiedenen Menge an osmotisch aktiven Substanzen entspricht immer die gleiche Harnmenge. Der bestimmende Faktor für die Größe des Harnvolumens ist unter hydropenischen Versuchsbedingungen bei osmotischer Belastung einzig und allein der Gehalt des Harnes an osmotischem Gut. Die chemische Natur der Beladungssubstanzen hat dabei keinerlei Einfluß auf diese Gesetzmäßigkeiten. Wenn die Annahme zu Recht besteht, daß die Tubulusflüssigkeit in proximalen Tubulusanteilen dem Plasma isoton ist, läßt sich aus den soeben geschilderten Beobachtungen bei osmotischer Diurese der Schluß ziehen, daß die Konzentrierung des Harnes auf das endgültige Volumen ein rein physikalischer Vorgang ist. Der zeitlich und räumlich zuletzt stattfindende Prozeß muß dabei die distale Rückresorption von Wasser sein. Die charakteristische Abhängigkeit des Harn-

volumens vom osmotischen Harngut erklärt sich am einfachsten durch die Annahme, daß die Menge an festen Harnbestandteilen während und nach der Wasserrückresorption keine Veränderung mehr erleidet. Diese Annahme stimmt vollkommen überein mit den Befunden von Walker et al., die durch Mikropunktionen an Säugetiernieren erhoben wurden[13]:

"Three specimens were collected from the distal convolutions of rats under circumstances, which prevented contaminations by fluid from the collecting ducts (Table 1, Expts. 57 to 59). Two of these specimens (and one additional which was

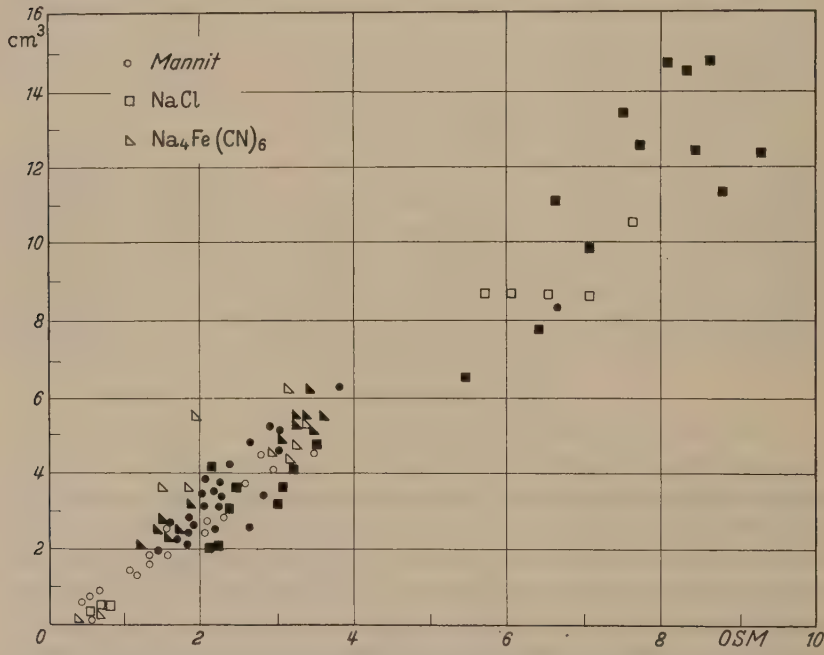


Abb. 3. Beziehung zwischen Harnmenge und osmotischem Gut. Ordinate: cm³ Harn pro Minute. Abscisse: Osmotisches Gut im Harn in Osmol pro Minute. Die schwarz gezeichneten Werte wurden nach der Verabreichung von Quecksilberdiuretica gefunden.

collected without this precaution) had osmotic pressures definitely below those of blood plasma, being approximately equivalent to a 0,8 per cent sodium chloride solution (Fig. 1). In both cases the osmotic pressure of bladder urine was above that of blood plasma. More data are required before any conclusions may be drawn, but if the low osmotic pressure of these tubule fluids be attributed to an active reabsorption of chloride and the high osmotic pressure of the bladder urine to a reabsorption of pure water (as distinct from fluid) then it would appear that the site of chloride reabsorption must be proximal to that of water ... they permit a suggestion, it must be the site of water reabsorption is in the late distal tubule or even in the post-distal connecting tubule rather than in the loop of Henle."

Nach den oben dargelegten Ausführungen, die durch die zitierten Befunde von WALKER et al. gestützt erscheinen, ist es nun möglich, mittels der osmotischen Diurese den Wirkungsort der Quecksilberdiuretika innerhalb des Tubulus näher zu lokalisieren. Es ist zu betonen, daß die eben besprochenen Beziehungen durch Narkose mit Barbituraten (Nembutal, Pernocton) nicht verändert werden[7].

In Abb. 3 sind die Beziehungen zwischen osmotischem Gut und Harnmenge dargestellt. Abb. 4 zeigt die entsprechende Relation zwischen Harnmenge und osmotischer Konzentration. In den beiden Abbildungen

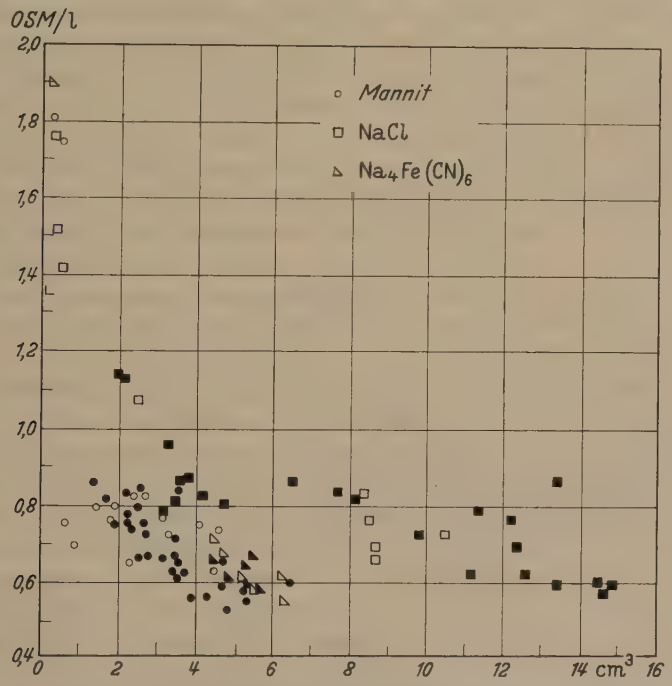


Abb. 4. Beziehung zwischen Harnmenge und Osmotischer Konzentration. Abscisse: cm³ im Harn pro Minute. Ordinate: Konzentration in Osmol pro Liter. Die schwarz gezeichneten Werte wurden nach der Verabreichung von Quecksilberdiuretica gefunden.

sind alle in unseren Versuchen gefundenen Werte vor und nach Quecksilberverabreichung eingezeichnet. Die Kurven entsprechen im wesentlichen den bereits früher publizierten Befunden[7]. Die bei der osmotischen Diurese gefundenen Gesetzmäßigkeiten werden somit durch Quecksilberpräparate nicht grundsätzlich verändert. (Über die bei längerdauernder Einwirkung der Quecksilberdiuretika auftretenden Abweichungen wird noch gesprochen werden.) Es ergibt sich daraus, daß die Wirkung der Quecksilberdiuretika proximal vom Ort der distalen Wasserrückresorption stattfinden muß.

Mudge, Foulks und Gilman[5] glauben, daß der Angriffspunkt der Quecksilberdiuretika im proximalen Tubulusanteil liegen muß. Allerdings gehen sie dabei von der Annahme aus, daß bei osmotischer Diurese der Harn dem Plasma isoton wird. Dies würde darauf hindeuten, daß in diesem Zustand jede distale Rückresorptionstätigkeit, die eine Eindickung des Harnes bewirken würde, ausgeschaltet ist. Die Zunahme der Salzausscheidung und damit des Harnvolumens unter der Quecksilbereinwirkung muß dann als ein im proximalen Tubulus stattfindender Effekt gedeutet werden. Wir konnten dagegen neuerlich bestätigen, daß die osmotische Konzentration des Harnes auch unter forcierter osmotischer Diurese immer noch über der des Plasmas liegt (siehe Abb. 4 und Tab. 1, 2, 3): die mittlere osmotische Konzentration des Plasmas beträgt etwa 330 mOsm/L und ändert sich auch bei osmotischen Beladungen nur wenig; die osmotische Konzentration des Harnes ist auch unter diesen Umständen immer noch 500—800 mOsm/L. Der Harn ist also bei osmotischer Diurese hyperton. Somit gehen die früher zitierten Autoren, die den osmotischen Druck des Harnes nicht experimentell bestimmten, sondern nur aus der Konzentration einiger seiner Bestandteile berechneten, von einer unberechtigten Annahme aus, wenn auch ihre Schlußfolgerungen mit den unseren übereinstimmen.

Andererseits fanden Pitts und Duggan[6], daß die saluretische Wirkung von Salyrgan einen bestimmten Maximalwert nicht überschreitet: auch bei Erhöhung der Salyrgandosis bis zu den Werten, die das Leben der Tiere gefährdeten, beträgt die im Harn ausgeschiedene Natriummenge höchstens 33% der im Glomerulusfiltrat enthaltenen. Die Autoren gelangen zu dem Schluß, daß nur der distale Teil der Harnbereitung, den Smith[14] als „facultative reabsorption" bezeichnet, von dem Quecksilberpräparat beeinflußt wird. Die Annahme eines Wertes von 33% für die „facultative reabsorption" ist jedoch mit den Befunden von Walker[13] et al. nicht vereinbar, die ein Mindestmaß von 80% der glomerulär filtrierten Natriumchloridmenge für die proximale Rückresorption annehmen. Aus Tab. 2 ist zu ersehen, daß in den hier wiedergegebenen Versuchen die Salzausscheidung bis zu 41% der filtrierten Menge betragen kann. Die Grenzen für die „facultative reabsorption" werden also unter diesen Umständen beträchtlich überschritten. Unsere Annahme, daß die Quecksilberwirkung proximal von einem Ort der distalen Wasserrückresorption stattfindet, sagt jedoch nichts darüber aus, an welchem anatomischen Ort oder in wieviel Stufen dieser „proximale" Prozeß der Salzresorption vor sich geht. Der Befund, daß auch unter höheren Dosen von Quecksilber nicht einmal die Hälfte der filtrierten Salzmenge ausgeschieden wird, läßt verschiedene Deutungen zu: die Salzrückresorption könnte in einem mehrstufigen

Vorgang stattfinden, von denen nur einer durch Quecksilber beeinflußbar ist; eine andere Möglichkeit wäre, daß nur einer der an der Salzrückresorption beteiligten Vorgänge innerhalb der Zellen ausgeschaltet wird.

In verschiedenen Arbeiten[15, 16] wurde festgestellt, daß der diuretische Effekt von Quecksilberpräparaten durch Zusatz von Purinkörpern verstärkt wird. Es erhebt sich nun die Frage, inwieweit Wirkungen der handelsüblichen Quecksilberpräparate auf den Purinanteil derselben zurückzuführen sind, um so mehr, als die Xanthine selbst ebenfalls starke Diuretika darstellen. Es scheint jedoch, daß der Zusatz von Theophyllin vorwiegend durch die verbesserte Resorbierbarkeit der Quecksilberpräparate diuresesteigernd wirkt[17]. In unseren Versuchen konnte jedenfalls bei intravenöser Verabreichung kein Unterschied zwischen reinem Salyrgan und theophyllinhaltigem Mersalyl festgestellt werden.

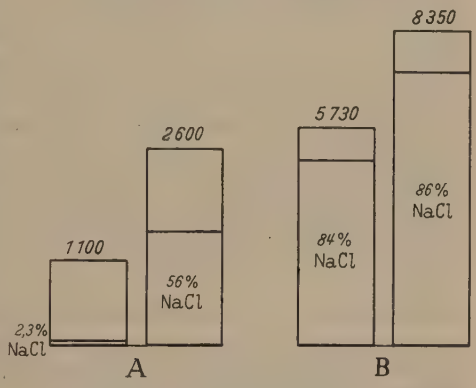


Abb. 5. Anteil von NaCl am gesamten Osmotischen Gut im Harn. A: Hund Struppi, 18,5 kg, Beladung mit 0,4 mOsm/kg Mannit. Osmotisches Harngut links vor 1,5 Mersalyl, rechts nachher. B: Hund Lizzi, 16,5 kg. Beladung mit 1,2 g/kg NaCl (= 41 mOsm/kg). Osmotisches Harngut links vor und rechts nach 1,5 cm³ Mersalyl. Die Höhe jeder Säule entspricht dem gesamten osmotischen Gut des Harnes, dessen Wert in mOsm/min oberhalb der Säulen angeführt ist. Innerhalb derselben ist der Anteil von NaCl angegeben. Aus Raummangel ist der Maßstab des Teiles B der Abbildung gegenüber jenem von A auf die Hälfte verkleinert.

Wenn auch unsere Versuche zeigen, daß unter Quecksilbereinwirkung die für die osmotische Diurese geltenden Gesetzmäßigkeiten beibehalten werden, so ergeben sich doch in bezug auf die Änderungen einzelner Harnbestandteile wie auch auf den zeitlichen Ablauf der Diurese wesentliche Unterschiede je nach der Beladungssubstanz.

Die osmotische Diurese durch Mannit ist gekennzeichnet durch eine lineare Abhängigkeit der gesamten Chloridausscheidung von der Harnmenge[18]. Die Harnchloridkonzentration bleibt somit bei dieser Diurese konstant, unabhängig von der Menge der zugeführten Beladungssubstanz bzw. von der Harnmenge. Versuche mit Manniturese eignen sich also in besonderem Maße zur Prüfung von Einflüssen, die die Chlorid- (oder Natrium-) Ausscheidung verändern. In Abb. 5A ist an einem Beispiel gezeigt, wieviel Natriumchlorid in der pro Minute ausgeschiedenen Menge osmotischen Gutes im Harn enthalten ist. Während vor der Quecksilberverabreichung der Anteil von Natrium-

chlorid am gesamten osmotischen Gut nur 2,3% beträgt (ein besonders niedriger Wert), steigt er nach der Quecksilber-Injektion auf 56% an. Da die Mannitausscheidung durch die Infusion auf einem konstanten Niveau gehalten wird, ist die Änderung der Gesamtausscheidung der osmotisch aktiven Harnbestandteile in diesem Falle nur durch die Zunahme der Natriumchloridausscheidung bedingt. Entsprechend den früher dargelegten Gesetzmäßigkeiten der osmotischen Diurese ist diese Mehrausscheidung von einer Steigerung des Harnvolumens gefolgt, die in dem hier beschriebenen Versuch von 1,41 auf 4,89 cm^3/min zunimmt. Die osmotische Konzentration des Harnes sinkt dabei von 780 auf 530 mOsm/L ab; der Harn wird also bei Mannitdiurese durch eine an NaCl relativ konzentrierte Flüssigkeit verdünnt. Aus diesem Versuch lassen sich zwei Folgerungen ziehen: 1. die Wirkung des Quecksilberpräparates beruht primär auf einer Steigerung der ausgeschiedenen Kochsalzmenge und 2. bewirkt die Steigerung des osmotischen Gutes die charakteristische Verringerung der Osmolarität des Harnes.

Bei Versuchen mit Kochsalzbeladung dagegen beträgt der Anteil des NaCl am osmotischen Harngut vor der Quecksilberverabreichung 84% (Abb. 5B). Durch die Erhöhung des Harngutes um 145%, die auch hier durch eine Vermehrung der Natriumchloridausscheidung unter Quecksilbereinwirkung verursacht wird, kommt es zu einer entsprechenden Zunahme der Harnmenge von 8,8 auf 14,5 cm^3/min. Dabei sinkt die Osmolarität von 650 auf 575 mOsm/L. Im Gegensatz zur Mannitdiurese nimmt jedoch hier der Anteil des Natriumchlorids am osmotischen Harngut nur um 2% zu. Trotz dieser Konstanz der Harnkonzentration ist die absolute Zunahme der Natriumausscheidung bei der Kochsalzbeladung etwa doppelt so groß wie bei der Mannitdiurese. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Mannitol und Kochsalzbelastung erwecken den Anschein, als ob sich die Wirkung des Quecksilbers auf die Natrium- und Chloridausscheidung immer gleichsinnig auswirkt. Die Ferrocyanidversuche erlauben eine Prüfung dieser Annahme. Durch den Antagonismus des Ferrocyanidions gegenüber einwertigen Anionen wird bei osmotischer Diurese durch Natriumferrocyanid die Chloridkonzentration des Harnes im Vergleich zur Natriumkonzentration äußerst gering. Unter Quecksilber kommt es nun bei gleichbleibender Natriumkonzentration zu einer Verdoppelung der Chloridkonzentration. Die Wirkung von Quecksilber äußert sich hier in einer Herabsetzung der Fähigkeit der Niere, das Konzentrationsgefälle für Chloride zwischen Plasma und Harn aufrechtzuerhalten. Da im Falle der Ferrocyaniddiurese ein steiles Gefälle für die Chloride besteht, wirkt sich der Quecksilbereffekt besonders sichtbar in der Konzentrationsänderung dieses Ions aus. Dieser Befund unterstützt die Annahme, daß die Niere imstande ist, die Konzentration

von Natrium und Chlor in der Tubulusflüssigkeit unabhängig voneinander zu variieren. Die Fähigkeit der Niere, die Konzentration dieser beiden Ionen unabhängig voneinander zu verändern, wurde auch schon von GOLDZIEHER et al.[19] postuliert. Die Verhältnisse bei der Ferrocyaniddiurese geben auch einen Hinweis auf den Wirkungsort der Quecksilberdiuretika: Wie aus den Versuchen von WALKER et al.[13] hervorgeht, ist die rückresorbierte Menge von Chlor an einer bestimmten Tubulusstelle etwa dem vom Glomerulus her zurückgelegten Weg proportional. Es bildet sich daher die für die Ferrocyaniddiurese typische Ionenverteilung erst relativ distal aus. Die besonders augenfällige Steigerung der Chloridausscheidung unter Quecksilber bei der Ferrocyaniddiurese zeigt, daß die Wirkung dieses Präparates an einem Ort stattfinden muß, in dem sich die für diese Beladung typische Ionenverteilung bereits eingestellt hat. Es besteht somit möglicherweise keine Diskrepanz zwischen der Auffassung von PITTS und DUGGAN[6] über einen distalen Angriffspunkt der Quecksilberdiurektia, wenn man annimmt, daß der anatomische Ort dieses „distalen" Angriffspunktes proximal von der Stelle der Rückresorption von reinem Wasser liegt.

Die in Abb. 3 und 4 dargestellten Punktescharen lassen nicht eindeutig erkennen, ob nach Quecksilberverabreichung eine systematische Abweichung von der normalen Relation zwischen osmotischen Gut und Harnvolumen bzw. zwischen Harnmenge und osmotischer Konzentration besteht: die in den Abbildungen schwarz gezeichneten Punkte entsprechen den Werten nach Quecksilberverabreichung; sie liegen innerhalb oder höchstens an der unteren Grenze der normalen Streuungsbreite. Aus diesen Abbildungen ist demnach ein deutlich erkennbarer Einfluß von Quecksilber auf die Konzentrationsfähigkeit der Niere nicht zu entnehmen. Sowohl die Tabelle als auch Abb. 6 lassen aber erkennen, daß etwa 1 Std nach der Quecksilberinjektion die für die osmotische Diurese charakteristischen Gesetzmäßigkeiten nicht mehr eingehalten werden: zu diesem Zeitpunkt ist die einer bestimmten Harnmenge entsprechende Konzentration gegenüber jener bei derselben Harnmenge vor Quecksilberverabreichung deutlich herabgesetzt. So entspricht z. B. bei dem Versuch in Abb. 6 einer Harnmenge von 2,5 cm^3/min eine osmotische Konzentration von 820 mOsm/L, während sie am Ende des Versuches bei der gleichen Harnmenge auf 730 mOsm/L abgesunken ist. Dieser Befund zeigt, daß im weiteren Verlauf der Quecksilberdiurese auch die distale Wasserrückresorption und damit die Konzentrationsfähigkeit der Niere herabgesetzt wird.

Auf die Verschiedenheiten im zeitlichen Verlauf und im Ausmaß der Quecksilbersalurese zwischen kochsalzbedingter und mannitbedingter

osmotischer Diurese wurde schon hingewiesen. Der Gesamtablauf der Quecksilberwirkung ist bei Kochsalzbeladung verkürzt und beschleunigt — sozusagen komprimiert —, und das Ausmaß der Salurese ist, absolut genommen, ein Vielfaches von der durch Mannit erzielten Wirkung. Die Erklärung dieser Unterschiede ist noch nicht gegeben, doch soll eine vorläufige Deutung versucht werden, die zum Schluß führt, daß sich die Quecksilberwirkung im Bereich des distalen Anteiles des proximalen oder im proximalen Abschnitt des distalen Tubulus abspielt.

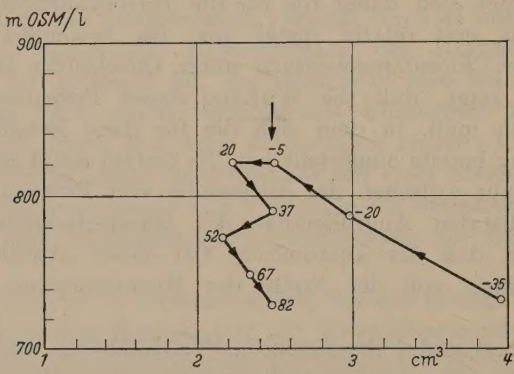


Abb. 6. Einfluß von Hg-Diuretica auf die distale Wasserrückresorption. Hund Toto, 21 kg. Beladung mit 4,0 mOsm/kg Mannit. Abscisse: cm³ Harn pro Minute. Ordinate: Harnosmolarität in mOsm/L. Die Richtung des zeitlichen Ablaufes des Versuches ist im Kurvenzug angegeben. Der Pfeil oberhalb der Kurve bezeichnet den Zeitpunkt der Injektion von Mersalyl. Bei jedem Punkt ist in Minuten der zeitliche Abstand von der Hg-Injektion angegeben.

Warum der distalste Anteil der Kanälchen, in dem die Wasserrückresorption allein stattfindet, nicht in Betracht kommt, wurde schon besprochen. Für die Abgrenzung nach oben hin läßt sich folgende Überlegung anführen: Sowohl Mannit als auch Kochsalz bedingen nur eine geringe Veränderung in der Zusammensetzung des Plasmas oder des Glomerulusfiltrates. Während des Durchganges durch den proximalen Tubulus, in dem die isotone Rückresorption stattfindet, steigert sich der Unterschied in der Zusammensetzung zwischen mannit- und kochsalzbeladener tubulärer Flüssigkeit, bis das endgültige Verhältnis der gelösten Bestandteile zueinander erreicht ist. Daher werden bei Mannitbelastung die Zellen der Tubuli mit einer im Salzgehalt ständig abnehmenden Flüssigkeit bespült. Im distalen Abschnitt des proximalen Tubulus sind die Zellen dann einer kochsalzarmen Flüssigkeit ausgesetzt. Sollte nun die Quecksilberwirkung sich in erster Linie auf den distalen Abschnitt beschränken, so würde selbst eine vollkommene Hemmung der Rückresorption aus der salzarmen Flüssigkeit nur eine geringe zusätzliche Salzausscheidung in den Endharn bewirken können. Anders im Kochsalzversuch: mit fortschreitender Rückresorption von Flüssigkeit im proximalen Abschnitt

ergibt sich ein beständig steigender Prozentgehalt von Kochsalz im Verhältnis zu anderen Bestandteilen der Tubulusflüssigkeit; die Zellen des distalen Abschnittes sind somit einer kochsalzreichen Flüssigkeit ausgesetzt. Derselbe Hemmungsgrad bewirkt eine um vieles größere Salzausscheidung. Der Quecksilbereffekt tritt um so ausgeprägter in Erscheinung, je salzreicher die tubuläre Flüssigkeit des distalen Abschnittes des proximalen Tubulus ist. Diese Hypothese stimmt auch mit den Ergebnissen und der Deutung der Ferrocyanidversuche überein.

Zusammenfassung.

Es wurde der Einfluß von Salyrgan ohne und mit Theophyllin (Mersalyl) auf die osmotische Diurese beim Hund untersucht. Die osmotischen Beladungen erfolgten mit Mannit, NaCl und Natriumferrocyanid. Der Quecksilbereffekt äußert sich bei allen drei Diuresearten in einer Erhöhung der Natrium- und Chloridausscheidung sowie in Zunahme der Harnmenge. Dabei bleiben die für die osmotische Diurese charakteristischen Befunde der Abhängigkeit der Harnmenge vom ausgeschiedenen osmotischen Gut und die Abnahme der osmotischen Harnkonzentration bei Zunahme der Harnmenge weitgehend bestehen. Es wird daraus auf einen Angriffspunkt der Quecksilberpräparate geschlossen, der proximal von einem Ort der distalen Wasserrückresorption liegt. Bei Salzbeladung ist der saluretische Effekt von Quecksilber ein Vielfaches von jenem bei Mannitbeladung, erreicht aber sein Maximum früher als bei Beladung mit Nichtelektrolyten. Quecksilberverabreichung unter Ferrocyanidbeladung zeigt, daß die Niere imstande ist, die Konzentration der Chloride unabhängig vom Natrium zu verändern. Im weiteren Verlauf der Quecksilberdiurese wird auch die distale Wasserrückresorption beeinflußt und somit die Konzentrationsfähigkeit der Niere herabgesetzt. Theophyllinfreies Salyrgan zeigte in unseren Versuchen keinen Wirkungsunterschied gegenüber einem theophyllinhältigen Präparat.

Wir danken Herrn cand. med. E. Windhager für die bei den Versuchen geleistete Hilfe.

Literatur.

[1] Govaerts, P.: C. r. Soc. Biol. Paris **99**, 647 (1928). — Arch. internat. Pharmacodynamie **36**, 99 (1929). — [2] Bartram, E. A.: J. Clin. Invest. **11**, 1197 (1932). — [3] Saxl, P., u. R. Heilig: Wien. Arch. inn. Med. **3**, 41 (1922). — [4] Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **130**, 61 (1928). — [5] Mudge, G. H., J. Foulks and A. Gilman: Amer. J. Physiol. **158**, 218 (1949). — [6] Pitts, R. F., and J. J. Duggan: J. Clin. Invest. **29**, 365 (1950). — [7] West, C., and S. Rapoport: Amer. J. Physiol. **163**, 159 (1950). — [8] Kaplan, S. A., and S. Rapoport: Amer. J. Physiol. **164**, 175 (1951). — [9] Roe, J. H., J. H. Epstein and N. P. Goldstein: J. of Biol. Chem. **178**, 839 (1949). — [10] van Slyke, D. D.: J. of Biol. Chem. **58**, 523 (1923). —

[11] Barber, H. H., and I. M. Kolthoff: J. Amer. Chem. Soc. **50**, 1625 (1928). — [12] Rapoport, S., C. D. West and W. A. Brodsky: Amer. J. Physiol. **157**, 363 (1949). — [13] Walker, A. M., P. A. Bott, J. Oliver and M. C. MacDowall: Amer. J. Physiol. **134**, 580 (1941). — [14] Wesson, L. G., W. Parker Anslow and H. W. Smith: Bull. N. Y. Acad. Med. **24**, 586 (1948). — [15] de Graff, A. C., and R. C. Battermann: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **32**, 1546 (1935). — [16] Hermann, G., G. M. Decherd, P. S. Erhard, C. C. Pearson, R. C. Douglas and E. Roberts: J. Labor. a. Clin. Med. **22**, 767 (1937). — [17] de Graff, A. C., R. C. Battermann and R. A. Lehmann: J. of Pharmacol. **62**, 26 (1938). — [18] Rapoport, S., and C. D. West: Amer. J. Physiol. **162**, 668 (1950). — [19] Goldzieher, J. W., and G. C. H. Stone: J. Clin. Endocrinol. **9**, 368 (1949).

Dr. H. Klupp, Wien IX/71, Währinger Straße 13A, Pharmakolog. Institut.